UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1943-1944

N° 6

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'HÉMOLYSE PAR LE VENIN DE " VIPERA ASPIS "

THÈSE

présentée et soutenue publiquement
le 18 JANV 1944 194
devant la Faculté de pharmacie
pour obtenir le
Diplôme Supérieur de Pharmacien

par

Madame Michèle DARRAUD, née CHASSAING

Examinateurs : M. Y. VOLMAR, professeur, président.
M. Ch. LAPP, professeur.
M. P. CORDIER, professeur.
M. G. DASTUGUE, professeur, suppléant.

CHARLES-LAVAUZELLE & Cie
Imprimeurs
PARIS
124, Boulevard Saint-Germain
LIMOGES-NANCY
1943

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1943-1944 N° 6

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'HÉMOLYSE PAR LE VENIN DE " VIPERA ASPIS "

THÈSE

présentée et soutenue publiquement
le 194
devant la Faculté de pharmacie
pour obtenir le
Diplôme Supérieur de Pharmacien

par

Madame Michèle DARRAUD, née CHASSAING

Examinateurs : M. Y. VOLMAR, professeur, président.
M. Ch. LAPP, professeur.
M. P. CORDIER, professeur.
M. G. DASTUGUE, professeur, suppléant.

CHARLES-LAVAUZELLE & Cie
Imprimeurs
PARIS
124, Boulevard Saint-Germain
LIMOGES-NANCY
1943

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✿, C. ❁.
VOLMAR, *Assesseur*, ✻, I. ✿.
MARANDON, *Secrétaire*, ✻, ⚷, ♁, ✿.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁.

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✿, C. ❁	Bactériologie.
	VOLMAR, ✻, I. ✿	Chimie organique.
	GUILLAUME, O. ✻, ⚷, I. ✿, ❁	Pharmacie galénique.
	LAPP, I. ✿	Chimie analytique.
	CORDIER, ✿	Pharmacie chimique.
	R. SARTORY, ✿, ❁	Matière médicale.
	DUQUENOIS	Toxicologie.
	N.	Botanique.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁.

COURS COMPLÉMENTAIRES.

MM.	A. SARTORY	Hygiène.
	VOLMAR	Chimie minérale.
	GUILLAUME	Zoologie.
	LAPP	Physique.
	PRÉLOT	Législation et déontologie.
	CORDIER	Chimie biologique.
	R. SARTORY	Cryptogamie.
	N.	Hydrologie.
	N.	Pharmacodynamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	COLLARD, ✻, ⚷, I. ✿	Chimie pharmaceutique.
	GAZET DU CHATELIER	Histoire naturelle.
	LEDOUX	Bactériologie et parasitologie.
	N.	Chimie et physique.

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR VOLMAR

Professeur de Chimie Générale
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg,
Membre correspondant de l'Académie de médecine,
Chevalier de la Légion d'honneur.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MES JUGES

Monsieur le Professeur LAPP

Professeur de Chimie Analytique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Monsieur le Professeur CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Professeur de Chimie Biologique
à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand.

Hommage de sincère gratitude.

A MES MAITRES
DE L'UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

Monsieur le Professeur DODEL

Professeur de Physiologie,
Lauréat de l'Académie de Médecine,
Médecin des Hôpitaux.

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Professeur de Chimie Biologique,
Lauréat de la Faculté et de l'Académie de Médecine,
Inspecteur régional des Pharmacies,
Pharmacien en chef des Hôpitaux.

Témoignage de vive et respectueuse reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

Leur vie, toute de travail et de dévouement, sera toujours pour moi le meilleur des exemples.

A MON MARI

A MA BELLE-MÈRE

A MON FRÈRE ET A MA BELLE-SŒUR

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

INTRODUCTION

On ne saurait s'étonner de voir une thèse de pharmacie consacrée à l'étude de la vipère. De tout temps la vipère a été employée en thérapeutique. La Thériaque d'Andromacus date du III*e siècle avant J.-C. et l'un de ses constituants, la poudre de vipère, ne fut supprimée du Codex qu'en* 1884. *A l'heure actuelle le sérum antivenimeux y figure toujours, et, ces temps derniers, certains auteurs ont tenté de mettre à nouveau la vipère à contribution dans la lutte contre le cancer.*

Ce qui pourrait surprendre à bon droit c'est de revenir sur cette question après les travaux considérables de Fontana, Phisalix, Calmette. *Nous nous permettons de faire remarquer que la plupart des études se rapportent aux colubridés et aux serpents exotiques. Si le venin de vipère a été étudié par* Phisalix, Cesari *et* Boquet, *il n'existe pas à notre connaissance d'étude systématique sur les propriétés hémolytiques du venin. C'est précisément pour essayer de combler cette lacune que nous avons entrepris ce travail. Que M. le professeur* Dastugue, *qui nous en a donné l'idée, trouve ici l'expression de nos vifs remerciements pour avoir eu l'obligeance de nous faire bénéficier d'une quantité importante de venin de vipère, produit extrêmement rare, que possédait son laboratoire, et nous avoir apporté au cours de ce travail l'appui de ses directives et de son expérience.*

Qu'il nous soit permis surtout d'adresser à notre Maître, M. le professeur Y. Volmar, *nos vifs remerciements pour l'honneur qu'il nous a fait de bien vouloir nous accepter dans son laboratoire à notre arrivée à Strasbourg. Les événements de ces dernières années nous ayant obligée à entreprendre ce travail à Clermont-Ferrand, il n'a cessé de nous témoigner la plus grande bienveillance et de nous prodiguer ses conseils éclairés et ses*

encouragements. Qu'il trouve ici l'expression de notre entière reconnaissance.

Nous témoignons également notre profonde gratitude à M. le professeur Ch. Lapp, *auprès de qui nous avons rempli les fonctions d'assistante pendant l'année* 1939-1940, *et à M. le professeur* P. Cordier, *qui nous ont toujours témoigné la plus vive sympathie et ont bien voulu accepter de faire partie de notre Jury de thèse.*

Nous tenons enfin à remercier tous nos Maîtres de la Faculté de Strasbourg et de l'Ecole de Clermont-Ferrand pour le précieux enseignement qu'ils nous ont donné.

PREMIÈRE PARTIE

Essai d'introduction à l'étude des propriétés hémolytiques du venin de "vipera aspis"

CHAPITRE PREMIER.

La " vipera aspis "

Il existe en France trois espèces de vipères : la vipère d'Orsini, la vipère Bérus et la vipère Aspic (*vipera aspis*). Cette dernière n'est pas rare en Auvergne. Pendant l'hiver, elle se cache sous la mousse, au fond d'un creux d'arbre, dans un trou de mur. C'est une période de jeûne absolu où, suivant l'expression populaire, la vipère « vit de sa graisse ».

Dès les premières chaleurs la vipère commence à sortir. Elle quitte sa retraite pour se chauffer au soleil. Mais quand la température s'élève elle regagne volontiers les coins d'ombre.

La vipère chasse de préférence au crépuscule. Elle se blottit dans les broussailles qui tamisent la lumière, et là elle attend sa proie. Dans l'estomac des jeunes vipéreaux on trouve des débris de vers et d'insectes. La vipère adulte se nourrit, en outre, de souris, campagnols, mulots, rats, oiseaux au nid et lézards.

En été la vipère habite principalement des coteaux secs et rocailleux inclinés vers le midi, couverts de taillis et de ronces. On en rencontre aussi beaucoup dans les vignes, sous les tas d'échalas. C'est dans tous ces endroits qu'ira les prendre le chasseur de serpents (1).

Comme tous les serpents, la vipère mue de temps en temps. C'est au cours de l'été que les mues sont les plus fréquentes. On dit vulgairement que « la vipère change de peau »; en réalité, il ne s'agit que du départ de la couche la plus externe de l'épiderme.

Il existe deux périodes pour l'accouplement : une, au printemps; l'autre, à l'automne. Il n'est pas rare à cette époque de rencontrer des « boules de serpents ». La vipère aspic pond de 4 à 12 petits chaque année. Elle est ovovivipare; en effet, le jeune vipéreau brise la membrane de l'œuf aussitôt après la ponte. Quelquefois la mince membrane de l'œuf se rompt au passage et le vipéreau s'en échappe directement sans avoir à déchirer lui-même cette membrane. Dès leur naissance, la vipère aban-

(1) Les personnes qui fréquentent l'Hôtel-Dieu connaissent bien la silhouette, pour eux familière, de notre chasseur, Jean-François MIGNOT, à qui l'on doit depuis de nombreuses années la capture de milliers et de milliers de vipères.

donne ses petits. Ils sont du reste en état de subvenir seuls à leurs besoins, et leur morsure peut tuer un petit oiseau ou une souris. Au bout de quatre ou cinq ans l'animal a atteint son complet développement.

La vipère n'attaque pas l'homme. Il n'y a rien à craindre d'elle lorsqu'elle circule librement. Elle ne se défend que si on l'attaque ou si on l'effraie. Ainsi, on peut tenir impunément un jeune vipéreau dans le creux de la main. La capture de la vipère est assez facile, car ses allures sont lentes ; mais elle est prompte à la détente lorsqu'elle se croit menacée. Il faut immobiliser la tête du serpent soit avec une baguette souple qui plaque le reptile au sol soit avec une baguette fourchue qui enserre l'animal au collet et pincer ensuite le cou entre deux doigts. Il est encore possible, mais plus dangereux de saisir le serpent par la queue que l'on soulève vivement. L'animal essaie de se redresser et de se retourner pour mordre, mais ses tentatives restent vaines, car il ne peut guère relever la tête à plus du tiers de sa hauteur.

Les vipères capturées sont placées dans une cage ; il n'est plus question ici d'alimentation car en captivité elles n'acceptent aucune nourriture ; bien plus, si on les gave, elles vomissent. Il suffit de mettre à leur portée un petit récipient d'eau pour les voir survivre pendant parfois plusieurs mois. Encore cette minime précaution n'est-elle pas toujours indispensable et il n'est pas rare de pouvoir conserver jusqu'au début du printemps des vipères capturées à la fin du précédent automne.

Dans la cage nous pouvons examiner la vipère tout à loisir : longue de 60 à 65 centimètres, elle a un tronc bien séparé de la tête et terminé par une queue courte (7 à 9 centimètres). La coloration de la face dorsale est très variable : grise, jaunâtre, parfois brune ou rouge sanguine avec des taches noires paires ou des barres transversales, ou bien en zig-zag. Les « vipères rouges » ont, sans raison, plus mauvaise réputation que les autres. Les dessins sont plus variés et plus foncés chez le mâle que chez la femelle. La face ventrale est ordinairement jaunâtre, blanchâtre, ou rosée avec ponctuation chez la femelle. La tête est triangulaire, le museau plat en dessus, plus ou moins relevé à l'extrémité avec une marque en V sur le sommet et un trait noir derrière l'œil. Mais deux organes paraissent particulièrement dignes d'attention : la langue et la pupille.

La langue à la forme d'un petit cylindre légèrement brunâtre à sa base, puis franchement noir, de un millimètre et demi de diamètre sur près de deux centimètres de long. A son extrémité antérieure elle se bifurque en deux filaments parallèles d'un centimètre qui se terminent en s'amincissant. Il s'agit d'un organe essentiellement protractile, comme la langue des batraciens, qui peut être largement projeté en dehors de la cavité buccale.

Les yeux, relativement grands, sont protégés par une plaque sourcilière qui les surplombe. La pupille, à peine visible pendant le jour, se dilate pendant la nuit. Cette pupille a la forme d'une ellipse dont l'axe vertical est très long. Billard et Dodel ont insisté sur cette disposition

qui se retrouve chez la plupart des chasseurs à l'affût (félidés, renards, serpents venimeux, boas, crocodiles), alors que les autres chasseurs, en particulier les chasseurs à courre (canidés, mustellidés, singes) ont une pupille circulaire.

La vipérothérapie (1).

Les vipères ne sont pas capturées pour le seul plaisir de les transformer en cadavres; mais depuis plus de vingt siècles elles paient un lourd tribut à l'art de guérir. Le premier médicament dans la composition duquel elles entrent date du IIIe siècle avant J.-C., c'est la « Thériaque d'Andromacus ». Au XVIIe siècle sa préparation fut confiée à Moyse Charas; et elle ne devait être supprimée du Codex qu'en 1908. Sous l'impulsion de Charas les vipères servirent à la préparation de nombreux médicaments.

« Faites-vous envoyer une douzaine de *bonnes* vipères du Poitou et faites-vous en faire du bouillon, car il n'est rien de tel pour les maladies de poitrine », écrivait Mme de Sévigné à Mme de Grignan qui se plaignait d'un « asthme ». Et c'est presque dans les mêmes termes que bien des médecins d'Auvergne s'adressent, chaque été, au Laboratoire de physiologie de Clermont pour réclamer des ampoules de bouillon de vipère qu'à l'exemple de leur maître, Billard, ils ont appris à utiliser chez leurs malades.

C'est en 1913 que Billard, qui étudiait le venin de vipère et cherchait un contre-poison ou une substance protectrice vis-à-vis de l'envenimation, eut l'idée d'essayer la « *macération de têtes de vipères* ». Le produit était obtenu de la façon suivante : les têtes de vipère, après avoir été détachées du corps de l'animal, et les glandes à venin, vidées aussi soigneusement que possible, étaient mises à macérer dans un flacon d'alcool à 95°. Après un intervalle d'un mois, les têtes de vipère étaient égouttées, séchées, broyées, pesées et additionnées de dix fois leur poids de sérum physiologique. Le tout était laissé en contact pendant vingt-quatre heures, puis exprimé sous presse. On obtenait un liquide citrin, qui était stérilisé par filtration sur bougie et finalement mis en ampoules de 2 centimètres cubes.

Tel est le médicament qui se révéla à l'expérimentation comme doué de propriétés diurétiques et antialgiques intéressantes et inattendues. Les résultats obtenus ne furent d'ailleurs interprétés qu'avec beaucoup de prudence par Billard qui, à notre connaissance, ne les publia même pas.

En 1930 un de ses anciens préparateurs, le docteur Barbes, qui avait eu l'occasion de confirmer ces heureux effets, crut pouvoir les rapporter au venin de vipère. Les glandes à venin étaient bien vidées, mais de façon incomplète, et la macération de têtes de vipère n'était, en somme, qu'une dilution homéopathique de venin.

---

(1) Expression empruntée à Mme Phisalix.

La question fut reprise de façon sensiblement différente, en 1934, sous l'inspiration du professeur Dodel, par L. Piton, du point de vue clinique, et par le professeur Dastugue, du point de vue expérimental.

Il suffit de prendre une vipère décapitée et d'immerger la peau détachée du tronc dans du sérum physiologique. Après une demi-heure d'ébullition on répartit en ampoules de 2 centimètres cubes qui seront utilisées en injections sous-cutanées.

Les effets obtenus se ramènent : d'une part, à un pouvoir diurétique remarquable; d'autre part, à une sédation des algies, sédation qui est particulièrement notable chez certains cancéreux. En même temps que la diminution des douleurs, on note une fonte sensible de l'œdème périganglionnaire au voisinage de la tumeur. Il est d'ailleurs facile, à titre d'hypothèse tout au moins, de relier entre eux ces trois phénomènes en supposant que le premier facteur en cause est un certain degré de déshydratation tissulaire se traduisant à la fois par un accroissement de la diurèse et une réduction des réactions périganglionnaires qui sont souvent à l'origine des douleurs des cancéreux.

Si on immerge, en effet, plusieurs muscles gastrocnémiens de grenouille, les uns dans des échantillons de véritable bouillon de peau de vipère, les autres dans des bouillons « à blanc », comportant les mêmes opérations et les mêmes composants (sérum physiologique) que les bouillons précités, mais sans peau de vipère, on peut déterminer avec précision le poids des uns et des autres à intervalles réguliers. On obtient dans tous les cas de la première série une diminution de poids du muscle immergé atteignant, au bout de trois à quatre heures, 10 à 30 p. 100 du poids initial. Pour tous les cas de la deuxième série (bouillons « à blanc ») il y a au contraire augmentation de poids, d'ailleurs faible (5 à 8 p. 100), mais constante. Il est donc permis d'opposer l'action du bouillon de peau de vipère qui produit une déshydratation à celle du bouillon sans vipère qui détermine une légère hydratation.

La question se pose alors de savoir quel est ou quels sont les éléments qui passent dans le bouillon, au cours de sa préparation au contact de la peau de vipère, et qui seraient responsables à la fois de la déshydratation constatée *in vitro* et de la diurèse provoquée chez le malade.

Le bouillon de peau de vipère se présente sous un aspect louche, opalescent, faisant soupçonner l'existence d'une assez grande quantité de lipides en suspension, et c'est à eux que certains auteurs ont attribué le pouvoir thérapeutique de la préparation.

Cependant, cette quantité de lipides est, en fait, moins considérable qu'on aurait pu l'imaginer et les dosages ont simplement indiqué une moyenne de 80 milligrammes de lipides totaux (dont la moitié environ de cholestérol) pour un litre de bouillon.

En résumé, bien que le mécanisme précis de son action reste encore à déterminer, le bouillon de peau de vipère doit reprendre, dès à présent, en thérapeutique, le rôle honorable que légitime son pouvoir de favoriser la diurèse et de calmer les algies de certains cancéreux.

La physiologie de la vipère.

La physiologie proprement dite de la vipère a été fort peu étudiée. Il semble que les recherches sur le venin et son mécanisme de sécrétion aient accaparé presque toute l'attention des auteurs. Pourtant la physiologie de la vipère pourrait apporter à la physiologie comparée et à la physiologie générale une importante contribution.

La coagulation du sang chez la vipère présente un certain nombre de particularités que Argaud et Billard signalaient dès 1911. Voici quelques centimètres cubes de sang recueilli dans un petit tube à essais. D'abord les globules tombent au fond du verre. Quelques-uns cependant surnagent; d'autres enfin, en très petit nombre, restent au contact des parois. On aperçoit alors au-dessus de la grosse masse rouge formée par le culot globulaire un liquide très légèrement bleuâtre et fluorescent.

Une heure environ après la saignée, à la température du laboratoire, une mince pellicule parsemée de quelques globules se forme à la surface du liquide. En crevant cette pellicule on peut facilement aspirer avec une pipette le plasma qui, au-dessous, est resté liquide.

Quelques heures après, ce plasma commence à se solidifier de bas en haut et finit par former, au bout de 12 à 24 heures, une gelée tremblotante qui adhère néanmoins suffisamment aux parois pour que le tube puisse être renversé.

Cette gelée est irrétractile. Conservée sous cloche, dans des vapeurs de chloroforme, elle ne laisse pas transsuder le sérum. C'est à peine si, au bout de plusieurs jours, on peut recueillir une ou deux gouttes de liquide pour une masse coagulée de 10 à 15 centimètres cubes par exemple. Cette gelée paraît *a priori* très dissemblable du réticulum fibrineux des mammifères et Argaud et Billard la rapprochaient plutôt du caillot sanguin des poissons, décrit par Nolf (1906). Le battage du sang, loin de retarder, accélère la production du gel. Aucune trace de fibrine n'adhère à l'agitateur. L'action d'un agent hémolysant (eau distillée) provoque également une coagulation rapide. Par contre, en recueillant le plasma, après sédimentation des éléments figurés, on peut le conserver liquide pendant plusieurs jours. Si le sang prélevé dans les conditions ordinaires est recueilli sur quelques fragments d'oxalate de soude, on n'obtient plus cette pellicule ni l'agglomération de globules qui l'accompagne ni la gélification du plasma.

L'analyse physico-chimique du plasma de vipère a été abordée par P. Dodel et P. Febvre, en 1932. Ces auteurs ont trouvé :

Point cryoscopique : 0,63.

Viscosité au Hess à 20° : 1,6.

Sodium : 3,90 g. p. 1.000.

Potassium : 0,30 g. p. 1.000.

Calcium : 0,19 g. p. 1.000.

Glucose : 0,10 g. p. 1.000.

Plus récemment, le professeur Dastugue et Maurice Massarani (1940) ont montré la richesse de ce plasma en lipides totaux et en cholestérol.

Voici les résultats obtenus au cours de cinq dosages dont chacun correspondait à une dizaine de vipères (sang recueilli par décapitation, animaux capturés au printemps).

Lipides totaux : 9,2 g. p. 1.000; 9,4; 11,4; 9,4 et 10,5. Moyenne : 10 g. p. 1.000.

Cholestérol total (méthode de Grigaut) ; 2,833 g. p. 1.000, 2,785; 3,575; 2,933 et 2,994. Moyenne : 3 g. p. 1.000.

Plus récemment, le professeur Dastugue et M^me^ Joy ont déterminé la teneur en :

— chlore globulaire : 1,85 g. p. 1.000;

— chlore plasmatique : 4,92 g. p. 1.000;

— glycémie : 0,21 à 0,29 g. p. 1.000;

— protides totaux : 59 g. p. 1.000.

— urée : 0,117 g. p. 1.000;

— acide urique : 0,25 g. p. 1.000;

— cholestérol de la bile vésiculaire : 0,20 g. p. 1.000.

Les éléments figurés ont été examinés, en 1940, par ces mêmes auteurs. De cette étude en cours signalons simplement les points suivants :

Les numérations ont été effectuées sur du sang recueilli par ponction cardiaque. La moyenne des chiffres trouvés pour les hématies est de 1.100.000 par millimètre cube avec de faibles variations d'un animal à l'autre. Par contre, le nombre des leucocytes semble osciller dans d'assez fortes proportions, puisque nous avons pu enregistrer des taux de 4.500 à 22.000 éléments par millimètre cube. Il est à remarquer que la fréquence des dispositions en placards rend malaisée une numération correcte. On note, d'autre part, l'absence de plaquettes sanguines, fait déjà signalé, pour le sang des animaux à hématies nucléées et qu'il faut peut-être rapprocher de l'irrétractilité du caillot que nous avons déjà décrite. Malgré une exploration minutieuse, il n'a pas été possible de déceler la présence de cellules fusiformes qui joueraient, selon certains histologistes, le rôle des hématoblastes.

L'hématie du sang de vipère est un érythrocyte présentant un contour elliptique et mesurant en moyenne 22 à 25 μ sur 10 à 15 μ. Il est pourvu d'un noyau plus ou moins ovalaire et légèrement renflé. Après coloration (May-Grunwald-Giemsa), le protoplasme des hématies apparaît teinté en jaune rosé, et le noyau, à fin réseau chromatinien, basophile, coloré en violet. L'exploration des préparations a permis de rencontrer, bien qu'en petit nombre, des érythroblastes, des hématies en mitose et avec corps de Jolly. Ces éléments se trouveraient donc à l'état normal dans le sang de vipère.

Parmi les globules blancs l'élément dominant est une cellule mononucléée, du type petit lymphocyte, à noyau volumineux et faible proto-

plasma. Sur les frottis, ces éléments parfois isolés sont fréquemment groupés en amas cohérents de 6, 8, 10 cellules ou plus. Les cellules basophiles, assez nombreuses, sont d'aspect muriforme, à grosses granulations très avides de colorant. Les cellules éosinophiles existent, mais sont relativement rares. Il y a, par ailleurs, des cellules, à noyau excentrique, à pigment ou à granulations, qui semblent d'une extrême fragilité et se colorent mal par la méthode de Romanowsky. Par endroits, éclatées par artefact, elles laissent échapper de petits grains ovalaires.

La moyenne des formules leucocytaires effectuées sur le sang d'une dizaine de vipères est la suivante :

Petits lymphocytes	79
Cellules à granulations basophiles	8
Cellules à granulations eosinophiles	2
Cellules indéterminées	11

Le fonctionnement du cœur a été bien étudié par Billard, Mougeot et Merle, en 1914. Ces auteurs ont insisté en particulier sur un phénomène observé par eux sur le cœur de la vipère et ensuite sur le cœur de la couleuvre et celui de la tortue; il s'agit du rythme à trois temps de la contraction cardiaque, le premier temps étant constitué par une systole coordonnée, massive et rythmique des veines caves supérieure et inférieure, survenant notablement avant la systole auriculaire.

Chez ces animaux, — probablement, pensent Billard et ses collaborateurs, parce que le sinus, *primum movens* du cœur et reliquat du tube cardiaque primitif, occupe une région entièrement séparée et distincte de l'oreillette droite et s'étend au niveau de la portion inférieure de la veine cave supérieure et sur une grande partie de la portion sus-hépatique de la veine cave inférieure — ces veines présentent, environ 20 à 30/100e de seconde avant la contraction auriculaire, une systole totale, brusque, très facile à observer *de visu* et absolument comparable aux systoles auriculaire et ventriculaire. Si le fait avait échappé jusqu'alors à l'observation c'est qu'il n'est pas visible si l'on examine le cœur en position normale et par sa face frontale. Il faut, après avoir mis à nu la région cardiaque avec les précautions nécessaires pour empêcher une hémorragie qui viderait les grosses veines, inciser le péricarde et surtout recliner le cœur sur sa face gauche; on voit alors distinctement le rythme à trois temps : 1° systole sinusale; 2° systole auriculaire; 3° systole ventriculaire.

En notant, à l'aide d'un index chronométrique marquant le cinquième de seconde, les successions des systoles : sinus, oreillette, ventricule, on constate, sur une vipère prise comme exemple, les valeurs suivantes :

— un cinquième 1/3 de seconde pour l'intervalle S-A;

— deux cinquièmes 1/2 de seconde pour l'intervalle A-V;

— trois cinquièmes 1/3 de seconde pour l'intervalle V-S.

Ainsi pour une durée cardiaque de durée totale égale à 143 centièmes de seconde la conduction sino-auriculaire prend 27 centièmes, la conduction auriculo-ventriculaire 50 centièmes et l'intervalle compris entre la systole ventriculaire et la systole sinusale qui marque le début de la révolution cardiaque suivante dure 66 centièmes.

L'aire à contractions massives et rythmiques du sinus veineux est très marquée chez la vipère, où elle s'étend en bas presque jusqu'au foie. L'examen histologique montre que la paroi des veines caves dans la région où ces veines sont animées de systoles, est constituée par des fibres musculaires striées ne présentant que des différences insignifiantes avec les fibres du myocarde.

L'intérêt de cette disposition, comme le signalent également Billard, Mougeot et Merle, sera de faciliter l'étude de l'action des poisons cardiaques sur la conduction sino-auriculaire, étude qui est très délicate chez les animaux de laboratoire où le sinus est enclavé dans l'oreillette droite.

Le cœur de vipère présente encore, et de façon remarquable, les propriétés spécifiques des organes autonomes. Il suffit d'immerger le cœur isolé dans une solution de Ringer pour que cet automatisme se manifeste pendant un temps fort long. En englobant dans une ligature à demeure le pédicule vasculaire qui s'échappe du cœur et en reliant d'autre part à l'aide d'un petit hameçon la pointe ventriculaire à un fil solidaire d'un léger levier, il est facile d'inscrire systoles et diastoles sur un cylindre enregistreur. Toutefois, si l'on voulait étudier l'action d'une drogue sur le myocarde mieux vaudrait utiliser une méthode de perfusion à la manière de Straub.

Quoi qu'il en soit, le cœur isolé de vipère s'accommode à merveille de solutions de Ringer, de composition sensiblement différente.. On pourra, cependant, utiliser de préférence soit l'une des formules (pour grenouilles) de Wachholder, par exemple : Cl Na 6,27 g.; ClK 0,154; Cl_2Ca 0,156; PO_4H_3 N/1 1,81 cm^3 et CO_3Na_2 q. s. p. un pH voisin de 7,1; soit la formule de Dodel-Febvre déduite de la composition du plasma de vipère telle qu'elle a été établie par les mêmes auteurs : Cl Na 8,4 g.; ClK 0,5; Cl_2Ca. $2H_2O$ 0,68; glucose 0,5; CO_3NaH 1 g.; eau distillée q. s. p. 1.000 centimètres cubes, qui présente un point cryoscopique de 0,63 et un pH de 7,2.

Avec cette solution *les muscles striés* présentent un gonflement insignifiant et conservent leur excitabilité pendant une cinquantaine d'heures.

La survie des muscles lisses est plus délicate à obtenir. La solution de Ringer employée a été la suivante : Cl Na 9 g.; ClK 0,5; Cl_2Ca, $2H_2O$ 0,67; glucose, 0,5; Cl_2Mg 0,01; CO_3NaH 0,5; eau distillée q. s. p. 1.000 centimètres cubes.

C'est avec une telle solution que P. Dodel, en 1932, a étudié *les réactions pharmacodynamiques de l'oviducte isolé* de vipère.

Les conditions de développement de l'œuf et de la parturition de *vipera aspis* se rapprochent de celles des mammifères pour ce qui est des phénomènes mécaniques tout au moins.

La vipère est ovovivipare, c'est-à-dire que le développement de l'embryon se fait aux dépens d'une réserve (*vitellus*), donc sans placenta, mais dans l'oviducte d'où l'embryon n'est expulsé que complètement formé. L'oviducte joue le rôle de l'utérus des mammifères, servant au développement de l'œuf et à son expulsion lorsque le terme est atteint. S'il est vrai qu'il n'y a pas de placenta, il existe néanmoins des communications vasculaires entre la mère et l'embryon soit directement soit à travers les annexes embryonnaires. L'oviducte isolé peut être maintenu en survie pendant plusieurs heures si on prend soin de l'immerger dans le liquide dont nous venons d'indiquer la formule à une température de 20 à 25°. Il se contracte alors rythmiquement d'une façon régulière après une phase d'hypertonie qui dure environ une heure. Passé ce délai, il peut réagir à certaines substances telles que le chlorhydrate d'acétylcholine (hausse du tonus et diminution des contractions à 1 p. 500.000), le lobe postérieur d'hypophyse (hausse du tonus et augmentation de l'amplitude des contractions au taux d'une unité pour 1.000 centimètres cubes), le chlorhydrate de pilocarpine (hausse du tonus et augmentation des contractions à 1 p. 2.000.000), le sulfate d'atropine (chute du tonus et diminution des contractions à 1 p. 500.000), le chlorhydrate d'adrénaline (chute du tonus sans diminution de l'amplitude des contractions à 1 p. 1.000.000).

En résumé, les réactions pharmacodynamiques de l'oviducte de vipère se rapprochent sensiblement de celles d'un organe de mammifère à musculature lisse et innervation périphérique sympathique et parasympathique.

Avec cette technique, P. Dodel, en 1932, — recherches reprises ensuite avec son élève M^me^ Touchard — a pu révéler l'existence dans le sang de la femme enceinte d'une substance particulière : la « ***substance empêchante*** ».

On sait, en effet, combien ont été discutées les causes de l'accouchement. Rappelons entre autres que certains chercheurs ont affirmé avoir mis en évidence dans le sang de la parturiente une substance qui, injectée à une femelle gravide ou mise au contact d'un utérus isolé, produirait de fortes contractions de cet organe. Les résultats des divers auteurs sont contradictoires.

Le professeur Dodel a repris la question en recherchant dans le sang de la femme enceinte une substance qui, jusqu'au terme, s'opposerait aux contractions utérines évacuatrices. Cette substance venant à disparaître, l'accouchement se produirait sous l'action des agents excitomoteurs de l'utérus en circulation constante dans le sang pendant toute la grossesse. De même Bouin et Ancel, dès 1910, admettaient que le fruit est une cause suffisante pour provoquer les contractions utérines du travail et que l'accouchement était dû à la disparition des facteurs qui assurent la tolérance (corps jaune et glande myométriale pour ces auteurs).

En utilisant comme réactif l'oviducte de vipère gravide dans les

conditions exposées plus haut, Dodel a pu faire les constatations suivantes :

1° Le sérum sanguin de femme non gravide, ajouté à la solution de Ringer, n'empêche pas l'effet de l'hypophyse.

2° Le sérum de femme gravide *empêche* l'effet de l'hypophyse.

3° Le sérum de femme en travail *n'empêche pas* l'effet de l'hypophyse.

4° Le sérum de femme, prélevé quelques jours après l'accouchement, *n'empêche pas* l'effet de l'hypophyse.

Il existerait donc dans le sang de la femme enceinte une substance s'opposant aux effets ocytociques de l'extrait de lobe postérieur; cette substance qui disparaîtrait au terme de la grossesse serait produite par le placenta.

A peu près à la même époque von Fekète aboutissait par une technique différente à des résultats analogues et plus récemment, en 1936, dans un important travail consacré à l'étude du déclenchement physiologique de l'accouchement, V. Donnet admettait des conclusions du même ordre.

Ainsi l'examen des phénomènes physiologiques — même lorsqu'ils se rapportent à un animal très éloigné de l'espèce humaine — peut toujours être profitable au médecin.

CHAPITRE II.

Le venin de " vipera aspis "

Récolte du venin.

On peut extraire le venin des glandes venimeuses soit sur la vipère fraîchement tuée soit sur le reptile vivant. Dans le premier cas, le serpent est saisi par le cou au moyen d'une forte pince et la tête est sectionné à l'aide d'une paire de ciseaux. Le tronc décapité est immobile, mais encore plein de vie. Si nous pinçons, en effet, son extrémité caudale, nous voyons l'animal sans tête réagir avec vivacité par un mouvement de reptation rapide, tandis que le moignon ensanglanté se dresse dans un élan d'attaque absolument analogue à celui d'un animal intact. C'est là une expérience parallèle à celle plus classique de Pfluger sur la grenouille décapitée. La tête comme le tronc a également conservé ses réflexes. Si nous introduisons une baguette de verre ou la pointe d'un scalpel entre les deux mâchoires, immédiatement la bouche s'ouvre et les crochets inoculateurs se projettent en avant pour s'implanter dans cette proie fictive.

Pour recueillir le venin nous introduisons un verre de montre entre les deux maxillaires et nous comprimons d'arrière en avant la région temporale. Le venin s'écoule par les crochets. Une morsure de vipère équivaut en moyenne à 30 ou 40 milligrammes de venin frais, soit 10 à 25 milligrammes de venin sec.

Propriétés physiques du venin.

Le venin frais est un liquide sirupeux légèrement teinté en jaune (1) ne présentant ni odeur ni saveur appréciable. Sa densité est légèrement supérieure à celle de l'eau dans laquelle il se dissout en toutes proportions. Les solutions présentent une réaction faiblement acide au tournesol par suite de la présence d'un acide volatil qui disparaît par la dessiccation de sorte que les solutions de venin desséché sont neutres. Desséché soit dans le vide soit au contact de l'air il laisse un résidu solide luisant, transparent, qui ne tarde pas à se craqueler dans tous les sens, formant

(1) Cesari (E.) et Boquet (P.) ont signalé l'existence dans le département du Gers de vipères fournissant du venin blanc.

des paillettes jaune miel sans organisation cristalline. C'est sous cette forme qu'il est conservé en tubes scellés sans perdre aucune de ses propriétés générales. Au contraire, les solutions dans l'eau distillée ou saline s'altèrent rapidement. On peut conserver leur toxicité initiale en les additionnant de leur volume de glycérine.

Les venins des vipéridés sont les moins résistants à la *chaleur*. Des solutions chauffées 15 minutes à 75° C ou 5 minutes à 80° C ne présentent plus de caractère toxique aux doses normalement mortelles. Le venin sec résiste à la chaleur. Le froid, par contre, est utilisé pour retarder l'altération des solutions.

La *lumière* a une action comparable à celle de la chaleur. Sans effet sur le venin sec, elle produit une altération des solutions d'autant plus rapide que la température est plus élevée. Une exposition aux *rayons ultra-violets* pendant soixante-dix minutes détruit l'echidno-vaccin; par contre, laisse intacts l'hémorragine et la neurotoxine. Lacassagne (A.) et Royer (M.) dans leurs recherches sur l'influence de l'inhibition sur la radiosensibilité montrent que le venin sec *irradié* ne subit qu'un affaiblissement à peine marqué; au contraire, les solutions dans l'eau perdent toute toxicité et leur pouvoir hémolytique et coagulant est fortement diminué.

L'*électrolyse* détruit la toxicité du venin en mettant en liberté des produits fortement oxydants (ozone, composés chlorés).

La *filtration* et la *dialyse* font perdre aux solutions de venin leur toxicité mais leur conservent néanmoins leur pouvoir vaccinant.

Action des agents chimiques.

En plus des agents physiques, diverses substances chimiques peuvent modifier ou détruire les propriétés du venin. Certaines ont été préconisées en cas de morsure, pour détruire le venin avant son entrée dans la circulation.

L'emploi du *permanganate de potasse* a été préconisé dès 1881 par de Lacerda. Son action a été discutée. Il semble, d'après Calmette, que l'inoculation immédiate d'une solution récente à 1 p. 100 prévient généralement la mort.

L'eau de chaux, le *chlorure de calcium*, l'*ammoniaque* sont sans action sur le venin de vipère. Ce dernier a joui longtemps d'une grande vogue, mais il est nettement à déconseiller à cause de sa causticité qui produit des phlyctènes.

Le venin de vipère est particulièrment sensible à l'action de l'*eau oxygénée*. Boquet (P.) émet l'hypothèse que cette sensibilité est liée à la présence dans ce poison d'un catalyseur spécial de l'oxydation ou de substances intimement unies à la phosphatidase et spontanément oxydables. L'addition de cuivre à l'eau oxygénée favorise l'atténuation de l'enzyme coagulant du venin; elle est sans effet sur la phosphatidase.

Les autres oxydants, les *hypochlorites*, en particulier l'eau de javel, agissent localement, « en modifiant les tissus touchés, ce qui met obstacle à l'absorption du venin ».

Les *acides* ont une action variable : l'acide sulfurique, phosphorique, phénique ne modifient pas la toxicité du venin; par contre l'acide chlorhydrique, nitrique, chromique à 1 p. 100 détruisent les propriétés toxiques. Ce dernier avait déjà été préconisé par Kaufmann, mais il est de plus en plus abandonné car il produit des escarres longues à guérir.

L'*alcool* est sans action sur le venin sec. Avec les solutions l'alcool, le chloroforme et l'éther donnent un précipité aussi toxique que le venin lui-même.

L'*aldéhyde formique* forme avec le venin un complexe inoffensif : anavenin (Arthus).

Les *sels biliaires* neutralisent chimiquement le venin. La cholestérine joue un rôle analogue. L'enrobage du venin de *vipera aspis* dans l'huile de vaseline cholestérolée ou dans la *lanoline* diminue la toxicité car le venin est libéré moins rapidement que des solutions aqueuses. [Richou (R.), Nicol (L.) et Ali Mustafa.]

La plupart des *savons* ont une action inhibitrice : *cryptovenin*. Cesari (E.) et Boquet (P.) ont étudié l'action du *ricinoléate de soude* qui, en vingt-quatre heures, à 37° C atténue l'action neurotoxique et coagulante. Cette détoxication ne s'effectue qu'en milieu légèrement alcalin et à certaines concentrations du ricinoléate de soude. Le même savon affaiblit le pouvoir nécrosant local. Privé de sa toxicité par le ricinoléate, le venin conserve néanmoins sa fonction antigénique.

Enfin, il faut noter le pouvoir « anagotoxique » des *eaux de Châtel-Guyon* et du *sulfate de spartéine* sur le venin de *vipera aspis*. Les bergers d'Auvergne ont remarqué que les moutons qui broûtent des pousses vertes de genêt paraissent moins alertes, ont une démarche ébrieuse; ils sont « gourds ». Or, pendant cette période d'intoxication passagère ils deviennent réfractaires à la morsure des serpents. Mais les feuilles de genêt renferment un alcaloïde : la spartéine. Billard, qui recueillit ces faits, provoqua chez le cobaye une intoxication nette mais non irréductible à la spartéine. Or, pendant qu'il est en état de « mal spartéinique » le cobaye supporte sans dommage une dose mortelle de venin de vipère.

Billard en vint à créer le terme de « phylaxie » pour désigner ce mode de protection si spécial. En effet, l'animal aurait pu être protégé soit par des injections progressives de venin soit par une seule injection de sérum antivenimeux, sérum provenant d'un autre animal vacciné au préalable : protection classique, protection banale, *protection spécifique* qui découle logiquement de toute l'œuvre pasteurienne. A l'opposé, la notion de phylaxie implique une *protection non spécifique* : une intoxication légère par un alcaloïde, la spartéine protégeant contre une dose mortelle d'un poison différent : le venin de vipère; conception également féconde, qui dépasse de beaucoup le cas particulier qui en a été la source, et dont les applications à la pathologie humaine se révèlent, tous les jours, plus étendues.

Propriétés physiologiques du venin (1).

De très nombreux travaux ont déjà, il est vrai, été publiés sur cette question. Nous rappellerons, à titre d'exemple, que du point de vue histologique, Argaud et Billard, examinant le sang de certains mammifères (lapin, cobaye, lérot, homme), quelques heures après une morsure de vipère, avaient signalé, en 1910, la présence d'hématies nucléées, microblastes et surtout normoblastes, libres ou groupées en plaquettes. La même année, Billard et Dechambre montraient qu'une solution aqueuse de venin de vipère à 1 p. 1.000 (1 centimètre cube) ajoutée à 5 centimètres cubes de sang de cobaye ou de lapin provoque une coagulation immédiate avec caillot irrétractile.

D'un point de vue plus général, nous dirons très sommairement que les venins, secrétions glandulaires, rentrent dans cette catégorie de substances, qui, mal définies chimiquement, exercent, au point de vue biologique, une action très complexe.

Nombreuses furent les tentatives de classer les venins; toutes se heurtèrent aux mêmes difficultés, à savoir l'absence d'une propriété bien définie pouvant servir de critère à une classification. C. Phisalix, dont les recherches sur les venins et en particulier sur le venin de *vipera aspis* demeurent classiques, distingue dans le venin de *vipera aspis* trois principes biologiquement différents : l'*échidnase*, substance phlogogène de nature diastasique, provoquant les réactions locales (œdèmes, escarre) ; l'*échidno-toxine*, à laquelle il attribue les troubles généraux (collapsus circulatoire, hypothermie) et l'*échidno-vaccin* substance ayant des propriétés vaccinantes et dépourvue d'action toxique.

Plus récemment, M. Arthus, à qui l'on doit les plus beaux travaux sur les venins en général, a proposé une classification des venins basée sur leur action physiologique. Il existe trois sortes de venins : 1° les venins curarisants (type *cobra*) ; 2° les venins protéotoxiques (type *crotalus adamenteus*) ; 3° les venins coagulants (type *daboïa*).

C'est sur du venin recueilli et conservé au laboratoire de Clermont que le docteur Halpern a pu entreprendre, en 1936, sous la direction de M. Gautrelet, une étude physiologique minutieuse. C'est dans le sens des modifications du système circulatoire qu'il a tout d'abord dirigé ses recherches.

L'injection intraveineuse de 1/30e de milligramme par kilogramme produit chez le lapin et chez le chien une hypotension artérielle très brutale et très prolongée. La pression tombe souvent à 2-3 centimètres de mercure et s'y maintient durant des heures. L'analyse du phénomène a révélé que parallèlement à cette hypotension il se produisait en dehors d'une spléno-contraction puissante une vaso-dilatation intense dans le domaine splanchnique et périphérique. L'étude directe des capillaires et

(1) Sous ce titre nous passons simplement en revue les propriétés les plus importantes du venin considérées du point de vue physiologique.

les recherches hématologiques l'ont amené à conclure que cette action circulatoir du venin de *vipera aspis* est tout à fait superposable à celle de l'histamine et se localise donc en dernier lieu à la périphérie, c'est-à-dire sur les capillaires.

Le venin de *vipera aspis* est dépourvu par contre de toute action sur l'excitabilité neuromusculaire : c'est un venin que M. Arthus classe comme poison protéotoxique pur.

Mais ce venin est encore doué d'une propriété fort curieuse : c'est un poison *hypothermisant* remarquable. C. Phisalix avait déjà signalé ce phénomène aux doses mortelles. Halpern a tenté d'en élucider le mécanisme. L'hypothermie, on le sait, peut être due soit à une accélération des processus de thermolyse, soit à une diminution de la production de la chaleur, soit encore aux deux processus réunis.

Or, d'après Halpern, dans l'action du venin de *vipera aspis*, il y a lieu de distinguer deux phases : dans une première phase, il y a surtout une augmentation de la thermolyse, qui est concomitante aux perturbations circulatoires et qui dépend vraisemblablement de ces dernières; dans une deuxième phase, le venin agit directement sur le métabolisme tissulaire qu'il abaisse. Par cette action sur les combustions cellulaires, le venin est susceptible d'exercer une action antagoniste vis-à-vis de certains hyperthermisants comme le dinitro-alpha-phénol. Les travaux de Magne, Mayer et Plantefol ont en effet montré que le dinitro-alpha-phénol élève la température et augmente les échanges par action directe sur les combustions cellulaires. Et il résulte des recherches de Halpern que le venin de *vipera aspis* exerce son action antagoniste vis-à-vis du dinitrophénol au point même où ce dernier attaque, c'est-à-dire au niveau de la cellule.

Le venin de *vipera aspis* constitue donc un poison capillaire (histaminique) et un poison hypothermisant.

Immunité et immunisation.

S'opposant au venin de cobra, riche en neurotoxine, le venin de la vipère et des vipéridés en général est remarquable par l'abondance de l'hémorragine. Il donne surtout lieu à des phénomènes locaux. Peu après la morsure, la région intéressée devient le siège d'une vive douleur qui se propage vers la racine du membre. En même temps, elle enfle et la tuméfaction s'étend aux régions voisines. A cette tuméfaction œdémateuse caractéristique se joignent des taches livides, noirâtres ou bleuâtres et des traînées de lymphangite.

Les accidents généraux lorsqu'ils existent sont de la somnolence, de l'insensibilité, de la dyspnée et des vomissements. La respiration devient de plus en plus gênée et la mort arrive par asphyxie. Lorsque la morsure est telle que le venin est inoculé par voie veineuse, les accidents généraux se produisent d'emblée et amènent une issue fatale en quelques minutes.

Telles sont les caractéristiques de l'envenimation pour le venin de *vipera aspis*. Toutefois, il y a des variantes. Ainsi le venin de la vipère d'Auvergne donne lieu à des accidents beaucoup plus marqués que celui de la vipère du Jura (Phisalix). De plus, l'action du venin est beaucoup plus intense au printemps qu'à l'automne. Mais surtout les animaux ne sont pas également sensibles à l'envenimation par la vipère.

La première immunité à signaler est celle de la vipère vis-à-vis de son propre venin, établie par Fontana dès 1780 et bien confirmée par Kaufmann en 1890. Mais cette immunité n'est pas absolue. Phisalix (1903) a montré que si elle est très élevée quand le venin est injecté par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale (dose mortelle (200 milligrammes), il suffit d'en introduire 3 milligrammes dans le cerveau pour amener la mort. Ajoutons d'ailleurs que ces 3 milligrammes suffiraient à tuer plusieurs cobayes. Il en est de même pour la couleuvre (Fontana, 1780; Phisalix et Bertrand, 1894). Le cobra lui-même serait peu sensible au venin de *vipera russelli* (Calmette). Parmi les autres animaux à sang froid, les batraciens, les lézards, les poissons sont tués par le venin de vipère. Les escargots, les sangsues seraient réfractaires (Fontana).

Après les poikilothermes, les oiseaux. Là encore, Fontana a ouvert la voie aux expérimentateurs en indiquant que le corbeau était réfractaire aux morsures de vipère. Les travaux de Billard et Maublant (1911) ont montré que ce privilège s'étendait également à la buse, à la chouette, à l'oie et au canard domestiques. Il suffit de se rappeler la place occupée par les oiseaux parmi les destructeurs de vipères pour saisir l'intérêt de semblables recherches.

La plupart des petits mammifères succombent aux morsures de vipères : tels le cobaye, le rat, le lapin. Chez les gros mammifères la mort arrive moins souvent; les troubles généraux sont intenses, mais fréquemment, au moins chez l'animal adulte et comme cela se produit pour les chiens de chasse, la guérison survient. Il y a néanmoins des cas de mort parmi les gros mammifères et on en a cité qui étaient relatifs à des chèvres, des brebis et même des chevaux (Kaufmann).

Il est, par contre, des mammifères réfractaires au venin de vipère. Calmette, dans un travail paru en 1909, en signalait trois : le hérisson, le porc, la mangouste. Billard et Maublant, en 1911, constatèrent la grande sensibilité du furet et du putois, l'immunité du lérot, du blaireau et du chat domestique.

Des serpents venimeux beaucoup plus gros que la vipère sont détruits par les chats. C'est du moins un fait que certifient de nombreux voyageurs et naturalistes. Cependant aucune observation précise n'avait été faite au sujet de l'immunité du chat contre les morsures de vipère.

Laissons Billard nous raconter lui-même l'une de ses expériences : « Un chat angora, âgé de six mois, est placé dans une cage avec une grosse vipère. Celle-ci se dirige vers lui en sifflant, mais d'un coup de patte très vivement appliqué sur la tête, le chat la renvoie dans un angle de la cage. Bientôt se produit une nouvelle attaque de la vipère. Le chat décoche un nouveau coup de griffe à la tête et bondit par-dessus le serpent,

qui, par suite de l'espace réduit où a lieu le combat, peut mordre le chat sous le ventre. A partir de ce moment, il est impossible de provoquer une attaque de part et d'autre. La vipère est examinée et on constate qu'elle n'a plus de crochets : elle les a laissés dans la peau du chat. Celui-ci, indifférent aux évolutions de son adversaire replacé près de lui, ne songe qu'à s'échapper de sa cage. Le lendemain, la vipère est morte, le chat bien portant. Les seules complications observées à la suite de la morsure se réduisent à des accidents locaux : un peu d'œdème de la région mordue et chute des poils au bout de quelques jours. La santé de l'animal resta bonne par la suite ».

De même, l'injection intrapéritonéale, à un chat de trois mois, de 1 milligramme et demi de venin n'est pas mortelle.

Une question se pose immédiatement. Cette immunité naturelle est-elle transmissible? En d'autres termes, l'injection de sérum d'un animal réfractaire immunise-t-elle un animal sensible?

Des expériences nombreuses ont été faites dans ce sens sur le cobaye. Elles se sont montrées positives avec le sérum du hérisson (Phisalix et Bertrand) (1) et celui du lérot; négatives avec le sérum du chat (Billard).

Nous passons ainsi de l'étude de l'immunité naturelle à celle de l'immunisation. On sait que grâce aux travaux de Phisalix et Bertrand (1894), de Calmette (1894) il est possible de vacciner des animaux contre le venin. Le sérum des animaux ainsi préparés injecté à dose convenable à un animal neuf immunisera à son tour celui-ci contre les accidents de l'envenimation.

Pendant longtemps les chevaux furent vaccinés par injection de faibles doses de venin. Ce dernier était soumis au préalable à l'action d'une solution d'hypochlorite de chaux à 1 p. 100. L'immunisation était lente, durait seize mois, et était fertile en accidents. Actuellement, on immunise les chevaux en trois mois par les anavenins, c'est-à-dire des venins dont la toxicité est supprimée — par contact avec le formol — mais qui, inoculés aux animaux, sont susceptibles d'engendrer une immunité équivalente à celle que l'on obtient avec le venin normal (M. Arthus).

Le sérum antivenimeux de l'Institut Pasteur doit être dosé de telle façon que 1 milligramme de venin desséché dissous dans 1 centimètre cube de sérum puisse être injecté sans dommage, — après une demi-heure d'étuve à 37° — dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin. Quant au cheval dont provient le sérum il peut supporter 80 doses mortelles.

Ces résultats, dont l'importance pratique est si considérable, sont trop connus pour qu'il soit nécessaire d'insister. Nous ferons plutôt allusion encore aux expériences de Billard qui avait réussi à immuniser,

---

(1) Le sérum du hérisson est à lui seul toxique pour le cobaye; aussi faut-il, au préalable, le chauffer à 58° pendant un quart d'heure. Dépouillé de ses propriétés toxiques, il conserve néanmoins ses propriétés immunisantes.

De même, 5 centimètres cubes de sérum de chat injectés dans le péritoine d'un cobaye de 150 grammes déterminent une série de crises convulsives s'espaçant sur une demi-heure. Après quoi l'animal se rétablit.

contre des doses mortelles de venin de vipère, une série de cobayes, grâce au suc d'autolyse de foie de porc.

Un cobaye ayant reçu des injections préventives de 2 centimètres cubes de suc, quarante-huit heures et vingt-quatre heures *à l'avance*, peut être impunément mordu par une vipère. Un cobaye injecté avec du suc d'autolyse, un quart d'heure *après* la morsure résiste à l'envenimation. Les résultats sont identiques en substituant à la morsure une injection intrapéritonéale de venin desséché à la dose de un milligramme et demi pour 500 grammes de poids. Billard attribuait ces résultats à la richesse du suc hépatique en péroxydases, 1 centimètre cube de suc décomposant entièrement en une heure un litre d'une solution d'eau oxygénée neutre à 12 volumes.

Toutefois, une précision s'impose sur laquelle Billard a insisté à juste titre, dès 1910. On sait que les venins peuvent se différencier d'après les proportions respectives de toxines qu'ils renferment et notamment leur teneur en neurotoxine et en hémorragine. Nous avons déjà dit que le venin de cobra, par exemple, contient surtout des substances neurotoxiques paralysantes et très peu d'hémorragine. Au contraire, indépendamment des accidents généraux dus à la neurotoxine, la morsure de vipère (*vipera aspis* d'Auvergne) est remarquable par l'intensité des phénomènes locaux qu'elle détermine : œdème, suffusion hémorragique, escarre. Il y a donc chez les animaux mordus deux sortes de réactions : réactions locales que nous venons d'énumérer et réactions de l'état général se traduisant par une phase convulsive à laquelle fait suite la paralysie précédant la mort. Or, sur des cobayes préalablement immunisés contre le venin de vipère par des injections de suc d'autolyse de foie de porc Billard a pu observer une véritable anaphylaxie vis-à-vis de l'hémorragine. Tandis que les accidents d'ordre général dus à la neurotoxine étaient absolument nuls, la sensibilité en ce qui concerne l'hémorragine devenait telle que l'animal faisait, au niveau de la morsure, une escarre, d'étendue considérable, parfois même une suffusion hémorragique atteignant le tissu cellulaire sous-cutané de presque toute la moitié du corps.

Les injections répétées de venin de vipère produisent donc des accidents anaphylactiques très graves dus à l'hémorragine. De là pourraient provenir les échecs relatifs à la thérapeutique antivenimeuse de Calmette dans le traitement contre les morsures et le venin des vipères. Billard était convaincu que le sérum de Calmette était antineurotoxique, mais qu'il était dépourvu d'action sur les phénomènes locaux. Du reste, il existait déjà à Clermont un chasseur de serpents qui, presque tous les ans, était mordu et présentait toujours des accidents locaux d'une étendue parfois considérable. Dans deux cas observés par Billard et Maublant (1911), la phlogose, après morsure du pouce, s'étendait jusqu'à l'épaule tout entière. Traité par le sérum de Calmette, il ne présentait jamais d'accidents dus à la neurotoxine, mais toujours des accidents témoignant de son état anaphylactique : vomissements, diarrhée et état syncopal avec pouls rapide.

Un peu plus tard, — en 1912 — M. Arthus montrait qu'avec le venin de cobra l'immunité ne s'établit que pour la propriété curarisante et non vis-à-vis de l'action protéotoxique.

On peut donc conclure que parmi les symptômes que détermine l'injection des venins il en est qui s'atténuent, voire disparaissent après plusieurs inoculations, et d'autres vis-à-vis desquels le sujet se trouve au contraire sensibilisé ou anaphylactisé.

CHAPITRE III.

Le mécanisme de l'action hémolytique des venins

PREMIÈRES RECHERCHES.

Les premières recherches ayant trait à l'action hémolytique des venins de serpents semblent devoir être rapportées à Fontana (1781) qui expérimenta *in vitro* sur le venin de *vipera aspis*. Beaucoup plus tard, de Lacerda (1854) mentionnait, à propos du venin d'un lachesis, la déformation, la fragmentation, enfin la destruction complète des hématies placées en contact direct de ce venin.

En 1860-1861 Weir Mitchell signale qu'avec le venin de crotale les hématies subissent ou ne subissent pas de modifications suivant le temps de contact avec le venin et la concentration de celui-ci. Quelque temps après (1883) le même auteur, en collaboration avec Reichiert, observe un phénomène important déjà signalé par de Lacerda, à savoir l'agglutination des hématies. En 1872-1874 Fayrer et Brunton expérimentant sur les venins des thanatophides de l'Inde ne purent constater dans le sang des animaux envenimés que l'aptitude des hématies à s'empiler et à se créneler plus ou moins sur leurs bords. Au contraire, Feoktistow, en 1888, réussit avec des solutions à 2 p. 100 de venin de crotale et de *vipera berus* à obtenir la dissolution totale des globules rouges en dix-huit ou vingt-quatre heures. Peu de temps après, Ragotzi (1890) obtint un phénomène identique par action du venin de cobra sur les globules des mammifères. S'il s'agit des hématies nucléées de grenouille, il y a d'abord diffusion de l'hémoglobine, puis le stroma et le noyau sont finalement mis en liberté. C. J. Martin (1893-1896) effectua une série d'expériences sur le venin de *pseudechis porphyriacus*. Il constata que si l'on ajoute une solution de 1 p. 1.000 de venin (faite dans l'eau salée à 7 p. 1.000) à un égal volume de sang de grenouille on provoque, en une quinzaine de minutes, la désintégration des globules. Les hématies de pigeon présentent une résistance un peu plus grande; quant à celle des mammifères, elle paraît très différente suivant les espèces : les globules du chien sont les plus sensibles; ceux du lapin, du chat, du cobaye, du rat blanc et surtout ceux de

l'homme sont beaucoup plus résistants. Cunningham constate, en 1895, que le sang des mammifères ayant reçu une forte dose de venin de cobra fournit après leur mort un plasma rouge vif contenant l'hémoglobine et que les globules rouges des oiseaux (poule) sont pour la plupart réduits à leur noyau redevenu libre par dissolution du stroma. Weir-Mitchell reprend, en 1897, de concert avec Stewart, l'étude de l'hémolyse par le venin de crotale des globules du lapin, des serpents, du singe et de l'homme. Les auteurs constatent à nouveau que l'hémolyse se produit avec les solutions venimeuses de concentration moyenne, mais non dans les solutions très concentrées telles que celles que l'on obtient en mélangeant le venin frais à un volume égal de sang.

Stephens et Myers, en 1898, indiquent que l'action marquée qu'exerce le venin de cobra sur le sang de l'homme et de diverses espèces animales est empêchée par l'addition du sérum antivenimeux. Ce sérum, à lui seul, est capable de prévenir l'hémolyse *in vitro* à l'exclusion de tout autre sérum. Au voisinage de la dose minima mortelle pour le cobaye, la quantité de sérum antivenimeux nécessaire pour empêcher l'action hémolytique *in vitro* est sensiblement celle qui empêche la mort de l'animal. D'après les auteurs, cette neutralisation serait exclusivement chimique. Dans un travail postérieur, les mêmes auteurs établissent que l'action hémolytique des solutions concentrées de venin de cobra est moindre que celle des solutions plus faibles. Cependant les solutions fortes peuvent également acquérir un pouvoir hémolytique à la condition (Stephens 1899-1900) d'être accompagnées d'une quantité suffisante de sérum de cheval.

Stephens reprit également l'étude de l'action protectrice (vis-à-vis des hématies) des sérums antivenimeux (sérum anticobra). Il constate que de ce point de vue le sérum anticobra possède un pouvoir très fort vis-à-vis du venin de cobra lui-même, mais beaucoup plus faible vis-à-vis des venins *pseudechis porphyriacus*, de *crotalus terrificus* et de *vipera russelli*. Le sérum de cheval, qu'il s'agisse de sérum normal ou de sérum antivenimeux montrait d'ailleurs, d'après Stephens, une action assez inconstante car l'action protectrice pourrait être remplacée par une hémolyse progressive et rapide lorsque ce sérum est, par exemple, employé à doses incomplètement neutralisantes. Enfin, Stephens, pour essayer de dissocier les substances hémolytiques et toxiques du venin de cobra, emploie la filtration sous pression sur une bougie gélatinisée ayant préalablement servi à filtrer du sérum de bœuf : une solution à 0,25 p. 1.000 de venin de cobra est ainsi filtrée à plusieurs reprises jusqu'à ce qu'elle ne donne plus la réaction de l'albumine; le filtrat, chaque fois essayé quant à son action hémolytique et toxique, se montre encore actif après le troisième passage, mais non plus après le quatrième, où il donne faiblement la réaction du Biuret.

La connaissance des principes constituants du venin de cobra va faire un pas décisif avec les travaux de Myers (1900). Pour cet auteur il existerait dans le venin de cobra au moins deux substances toxiques :

l'une, hémolytique, qu'il appelle cobra-lysine; l'autre, qui entraîne la mort probablement par action sur le bulbe et arrêt respiratoire, et qu'il appelle cobra-neurine. Une dissociation de deux substances peut déjà être faite par l'action de la chaleur qui précipite la substance hémolytique avant de détruire la substance neurotoxique (Weir-Mitchell et Reichert). D'autre part, comme Stephens et Myers l'avaient déjà montré, c'est seulement au voisinage de la dose mortelle que la neutralisation de ces deux substances par le sérum antivenimeux suit une marche parallèle. Enfin, la sensibilité *in vitro* des hématies d'animaux variés ne présente aucune relation avec la sensibilité des mêmes animaux aux injections sous-cutanées de venin.

CHAPITRE IV.

Le mécanisme de l'action hémolytique des venins

THÉORIE CHIMIQUE.

La première découverte essentielle qui ait permis d'aborder de façon décisive le mécanisme de l'hématolyse sous l'action des venins est due à Flexner et Noguchi en 1902. Ces auteurs constatèrent, en effet, que certains venins ne dissolvent pas les hématies lorsque celles-ci ont été complètement débarrassées de leur sérum par plusieurs lavages successifs dans une solution isotonique de sel marin. Mais il suffit d'ajouter une trace de sérum correspondant pour que l'hématolyse se produise. On était ainsi amené à rapprocher le mécanisme de l'hématolyse par les venins et celui de l'hématolyse produite par les sérums.

Lorsqu'on inocule à plusieurs reprises à un lapin, par exemple, du sang défibriné de mouton, le sérum du lapin acquiert la propriété de dissoudre les globules rouges de mouton; ceux-ci mis en suspension dans de l'eau physiologique en un tube de verre et additionnés d'un peu de sérum de ce lapin, au lieu de se déposer intacts au fond du liquide incolore, abandonnent leur hémoglobine qui colore le liquide en rouge. Le sérum de lapin est devenu hémolytique pour les globules rouges du mouton.

Bordet a montré que l'hémolyse s'opère par le concours de deux substances ou plutôt de deux fonctions : l'un est l'alexine du sérum normal (détruite par la chaleur à 56° en une heure); l'autre est la sensibilisatrice du sérum des animaux immunisés comme notre lapin (elle résiste à la chaleur jusqu'à 68°-70°). Elle a reçu ce nom parce qu'elle prépare ou rend sensibles les hématies à l'action de l'alexine. L'alexine qui complète l'action de la sensibilisatrice a été nommée aussi : corps complémentaire ou complément.

D'après ces faits, le venin remplirait dans l'hémolyse le rôle d'une sensibilisatrice tandis que le sérum normal fournirait l'alexine. En d'autres termes, l'action hémolytique attribuée jusque-là aux venins eux-mêmes nécessite en fait la coopération de deux substances isolément inactives, l'une dérivant du venin et comparable dans la théorie d'Ehrlich

aux ambocepteurs des sérums préparés (sensibilisatrice de Bordet), l'autre contenue dans le sérum sanguin et qui joue vis-à-vis de la première le même rôle que le complément (alexine de Bordet).

La nature du sérum n'est évidemment pas étrangère au résultat obtenu. Flexner et Noguchi eurent l'idée d'étudier l'action complémentaire du sérum des serpents eux-mêmes. Le sérum était débarrassé de ses éléments sensibilisateurs par contact à froid avec les globules lavés de l'espèce sur laquelle on devait essayer l'hémolyse, puis séparé par centrifugation. Il contenait ainsi le complément pur.

Calmette, la même année, confirma la découverte des auteurs japonais; mais, de plus, il démontra que l'effet activant du sérum ne dépend pas de l'alexine qu'il renferme. Ce pouvoir activant, en effet, au lieu d'être détruit à 55-56° C subsiste même lorsqu'on porte le sérum à une température de 62° C. A cette température, le pouvoir activant des sérums peut être un peu diminué, mais, si on les chauffe à 100° C, le pouvoir activant de tous les sérums devient beaucoup plus élevé que celui des sérums non chauffés.

Bien mieux, Calmette démontre, en outre, que l'addition d'un excès de sérum frais agit sur le comportement du phénomène hémolytique déterminé par le venin de cobra en l'atténuant, voire même en l'abolissant. De ces faits l'auteur tire les conclusions suivantes :

1° Les sérums sanguins renferment une antihémolysine naturelle, thermolabile, susceptible d'être détruite par chauffage comme leur « complément » ordinaire;

2° Un complément thermostable doué d'un pouvoir activant vis-à-vis des poisons de serpents.

A la même époque (1902) Preston Kyes entreprit dans le laboratoire d'Ehrlich une série de recherches qui avaient pour but de préciser quelle était la principale substance du sérum résistant à la chaleur et servant de complément au venin. Kyes aboutit à la conclusion que la substance active était la lécithine libre. En se combinant au venin, elle donnerait un corps hémolytique considéré comme un composé chimique défini et auquel Kyes a donné le nom de venin-lécithide. Donc, d'après Kyes, la lécithine devrait être considérée comme jouant le rôle de complément dans la théorie d'Ehrlich et Morgenroth ou bien d'alexine dans la théorie de Bordet, mais une alexine thermostabile. Venin et lécithine forment ainsi suivant Kyes un couple hémolytique et leur combinaison représenterait l'hématolysine du venin.

La préparation du lécithide pur suivant les indications données par Kyes et modifiées par Manwaring est longue et délicate; mais pour obtenir assez rapidement et en petites quantités ce produit il suffit de mélanger une solution à 4 p. 100 de venin à une solution alcoolique de lécithine à 20 p. 100 à parties égales. On agite pendant plusieurs heures, le mélange étant maintenu à la température de 37° C. On ajoute 10 parties d'alcool absolu. On centrifuge. Le liquide surnageant décanté est additionné d'éther anhydre qui précipite le lécithide.

Soluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme, le toluène, insoluble dans l'éther et l'acétone, le cobra-lécithide possède une action hémolytique très prononcée qui s'exerce même sur les globules lavés et qui n'est pas neutralisée par le sérum antivenimeux correspondant. Le cobra-lécithide résiste pendant 30 minutes à la température de 100° C (Morgenroth). Ceci expliquerait, d'après Calmette, que le sérum des animaux qui ont été vaccinés par le venin de cobra préalablement porté à 72° C est néanmoins antihémolytique.

Le cholestérol joue vis-à-vis de lui le rôle d'un puissant antagoniste: mais cette action antagoniste n'est pas aussi accusée que celle qui s'exerce sur le mélange brut lécithine + venin (Kyes et Sachs, Flexner et Noguchi, Minz). Dans le complexe venin-lécithide le cholestérol détermine un précipité, et le liquide, surnageant, perd tout pouvoir hémolytique; mais ce liquide reste neurotoxique, ce qui établit l'indépendance des propriétés hémolytiques et neurotoxiques du venin.

Abderhalden et Le Count, en 1905, ont essayé de préciser le mécanisme de la propriété inhibitrice exercée par le cholestérol dans l'hémolyse venin-lécithide. Ils considèrent que le groupe hydroxyle libre est indispensable à l'action antihémolytique de cette substance. La même année, Flexner et Noguchi arrivaient à la conclusion que l'action empêchante du cholestérol s'exerce contre la lécithine et non contre le venin, comme le pensait Kyes. Ils constatent également que l'alcool méthylique en excès inhibe l'action empêchante de la cholestérine dans l'hémolyse par le venin-lécithide.

Un peu plus tard, 1907, Ishizaka retrouve l'action inhibitrice du cholestérol vis-à-vis de l'hémolyse par le venin de *lachesis flavoviridis;* mais pour cet auteur, comme pour Flexner et Noguchi, cette action serait le résultat d'une combinaison directe avec la lécithine et non pas avec le venin.

La conception de Kyes a été vivement combattue par Bang qui nie l'existence du cobra-lécithide en tant que combinaison chimiquement définie. Il conteste, en outre, que la lécithine pure soit douée d'un pouvoir activant vis-à-vis du venin et rapporte la propriété hémolytique de ce dernier à une fonction acide libérée par osmose.

Mais, poussant plus avant les travaux de Kyes, les recherches chimiques entreprises sous la direction de Wilstatter par Ludecke et les recherches biologiques de Von Dungern et Coca, de Morgenroth et Kaya et de Manwaring devaient établir qu'au cours de la réaction du venin sur la lécithine il se détache de l'acide oléïque. Les auteurs émirent l'hypothèse que le cobra-lécithine de Kyes est en réalité une « désoléolécithine » et que le venin se comporte vis-à-vis de la lécithine à la manière d'un ferment hydrolysant, une lipase.

CHAPITRE V.

Le mécanisme de l'action hémolytique des venins

THÉORIE DIASTASIQUE.

Une action diastasique de ce genre sur la combinaison venin + lécithine a été également signalée en 1907 par Neuberg et Rosenberg. Mais c'est aux travaux de l'Ecole française, et, notamment de Delezenne, M^lle^ Ledebt et Fourneau que revient le mérite d'avoir jeté une clarté nouvelle sur le problème de la combinaison venin-lécithine, sur la structure de l'hémolysine et sur l'influence de l'action diastasique du venin dans le mécanisme de l'hémolyse tant par le sérum que par la lécithine.

La méthode d'étude utilisée par ces auteurs consiste essentiellement à abandonner à eux-mêmes les mélanges de venin et de sérum avant de les porter au contact des hématies. Les expériences types ont été faites en utilisant du sérum de cheval que l'on additionnait de quantités variables de venin de cobra (1 milligramme à 1/10.000^e^ de milligramme par centimètre cube de sérum). Le mélange était abandonné pendant des temps variables à la température du laboratoire (20° C) ou à celle de l'étuve (40° C). L'activité des mélanges était appréciée par des prises aliquotes effectuées à certains intervalles et mises au contact d'une émulsion globulaire maintenue à la température de 18-20° C. Les expériences ainsi conduites permirent d'aboutir aux résultats suivants :

1° Quelle que soit la dose de venin employée, les mélanges acquièrent toujours, au bout d'un certain temps, une activité maximale correspondant à un pouvoir hémolytique intense et de valeur sensiblement égale. Le maximum ne dépend que de la quantité de sérum; il est indépendant de la quantité de venin; mais il est atteint d'autant plus rapidement que la richesse du milieu en venin est plus forte et la température plus proche d'une valeur optima.

Il ressort déjà de ces expériences que le venin doit agir à la façon d'un ferment libérant en quelque sorte une substance hémolytique à partir du sérum. Cette substance active existe bien réellement et peut être même extraite du sérum traité. Elle est soluble dans l'eau et l'alcool,

insoluble dans l'éther, résiste à la température d'ébullition et n'est pas neutralisée par le sérum antivenimeux. Cette substance dérive des phosphatides qui disparaissent du sérum au cours de la réaction, et elle doit avoir vraisemblablement la même constitution que la lysocithine isolée du vitellus de l'œuf traité par le venin. Cependant, en ce qui concerne le venin, cette substance n'a pas pu être caractérisée chimiquement de façon complète. Ce qu'il est possible d'affirmer c'est que le venin n'entre pas dans la constitution de cette substance. Il peut être, en effet, isolé du mélange à la fin de la réaction, et, détermine, s'il est mis en présence d'une nouvelle quantité de sérum, un nouveau pouvoir hémolytique identique au premier.

2° En prolongeant le contact entre le venin et le sérum on voit le pouvoir hémolytique, après avoir passé par un maximum, s'atténuer progressivement et disparaître. Cependant, si, à la période d'activité maximale, on ajoute au mélange une quantité de sérum antivenimeux exactement calculée pour obtenir la neutralisation du venin préalablement introduit, on constate que le pouvoir hémolytique du mélange ne décroît plus. Cette action est spécifique du sérum antivenimeux correspondant. Le venin qui était responsable de l'apparition du pouvoir hémolytique dans le mélange est donc aussi ultérieurement l'agent de sa disparition. D'autre part, l'étude attentive des phénomènes qui se déroulent dans cette seconde phase de l'action du venin sur le sérum a montré que le venin, après avoir libéré l'hémolysine aux dépens des phosphatides, la dédouble et met en liberté l'acide gras qu'elle renferme.

Cet acide gras se combinant aux sels de chaux du sérum se sépare spontanément du liquide, au cours de la phase d'inactivation, sous forme d'un précipité qui s'est révélé à l'analyse presque uniquement composé de savon calcique. Le rôle du calcium sanguin paraît être primordial au cours de cette phase d'inactivation de la lysocithine sous l'influence du venin car l'inactivation des mélanges venin-sérum ne se produit plus après élimination du calcium et reprend, au contraire, si l'on ajoute au sérum décalcifié du liquide céphalo-rachidien ou de l'humeur aqueuse. Enfin, lorsque les mélanges venin-sérum sont devenus totalement inactifs ils deviennent capables de manifester une action empêchante vis-à-vis de l'hémolyse des hématies directement sensibles au venin ou seulement détruites par le couple lécithine - venin. Cette action empêchante peut, dans certains cas, être aussi intense que celle du sérum antivenimeux. Elle disparaît complètement quand le mélange a été porté à la température de 75-80° C.

Arrivés au terme de leur évolution complexe, les mélanges venin-sérum ont conservé intact le venin qui y avait été ajouté primitivement, et celui-ci, qui possède encore toutes ses propriétés diastasiques, est capable de recommencer sur du sérum surajouté toute la série des transformations précédemment énumérées.

Ces résultats ont conduit Delezenne et Mlle Ledebt à envisager l'action exercée par les venins sur un milieu naturel plus riche que le sérum en lécithine : le vitellus de l'œuf de poule. Les auteurs furent amenés à

préconiser le vitellus au lieu de lécithine pure, d'une part, de manière à ce que la lécithine se présente de la sorte dans un état d'émulsion assez fine pour être aisément attaquée par les ferments, et, d'autre part, parce que la lécithine isolée, et, notamment le produit commercial, est une substance spontanément très altérable, très facilement souillée d'impuretés qui la rendent déjà plus ou moins hémolytique par elle-même. Dans les essais pratiqués avec le venin de cobra par exemple, les quantités de venin utilisées ont oscillé entre 1 milligramme et 0,00001 milligramme pour 1 centimètre cube d'une émulsion de vitellus d'œuf dans l'eau physiologique.

Le pouvoir hémolytique de ces mélanges était évalué, après des intervalles variables, en prélevant des quantités comprises entre 0,01 cm^3 et 0,001 cm^3 qui était porté au contact de 1 centimètre cube d'une émulsion globulaire à 5 p. 1.000. Dans ces conditions, les mélanges finissent toujours par acquérir, quelle que soit la dose de venin employée, un pouvoir hémolytique maximum qui est sensiblement le même dans tous les échantillons et qui, contrairement à ce qui se passe dans le cas du sérum, persiste si l'on continue à maintenir en contact vitellus et venin. Une fois la réaction terminée, on peut récupérer le venin par précipitation par l'alcool absolu et être ainsi à même de recommencer une action identique. De plus, le développement du pouvoir hémolytique se fait suivant les lois ordinaires des actions diastasiques. Le produit qui se transforme est bien la lécithine, car l'extraction et le dosage de cette substance montrent qu'elle disparaît au cours de la réaction, alors que la kinase pancréatique qui dédouble complètement les graisses neutres que renferme le vitellus laisse le milieu complètement inactif vis-à-vis des globules rouges. D'autre part, si l'on ajoute à l'origine du sérum antivenimeux spécifique au mélange vitellus-venin on constate que ce sérum empêche totalement la transformation de la lécithine et le développement des propriétés hémolytiques ; quand celles-ci sont apparues, le sérum antivenimeux se montre, au contraire, totalement inefficace. Ce fait démontrerait, d'après les auteurs, que le sérum antivenimeux contient une antidiastase spécifique (une antiphosphatidase) à laquelle il faudrait rapporter les actions dites antihémolytiques des sérums spécifiques antérieurement observés.

Enfin, Delezenne et M^lle^ Ledebt mentionnent que la diastase lipolytique des venins présente vis-à-vis de la température une résistance tout à fait particulière. Dans le venin de cobra, par exemple, elle n'est pas détruite par un chauffage, même prolongé, à la température de 70° C ; et il faut atteindre la température de 100° C maintenue pendant un quart d'heure ou une demi-heure pour la voir disparaître totalement. Elle résiste même à un chauffage de quelques heures à la température d'ébullition si l'on a pris soin, au préalable, d'ajouter une quantité d'acide chlorhydrique tel que le milieu ait une acidité égale à 1/10^e^.

Pour isoler et caractériser la substance hémolytique du mélange vitellus-venin, Delezenne et Fourneau (1914) ont adopté la technique suivante : quand le mélange a atteint son activité maximum, il est desséché aussi rapidement que possible dans le vide sulfurique, broyé et épuisé

par l'acétone à froid. Le résidu redesséché est repris par l'alcool absolu à froid et le soluté, concentré dans le vide, est précipité par l'éther anhydre; on achève de purifier par dissolutions (dans l'alcool) et précipitations (par l'éther) successives. A cette substance, qu'ils ont pu obtenir à l'état chimiquement pur par cristallisations répétées dans l'alcool absolu, les auteurs ont donné le nom de lysocithine. C'est une substance très soluble dans l'eau tiède et dans l'alcool absolu à chaud, très peu soluble dans le chloroforme, presque insoluble dans le benzène et l'éther de pétrole, insoluble dans l'éther, l'acétone et l'éther acétique.

La lysocithine est l'anhydride de l'ester palmitophosphoglycérique de la choline, mélangé d'un peu d'ester stéarique. Le venin de cobra enlève donc à la lécithine les acides non saturés qu'elle renferme. Ceux-ci se retrouvent intégralement dans l'extrait acétonique du vitellus traité par le venin. Quand la réaction est complète, non seulement l'hémolysine brute ne renferme plus de lécithine mais les lipides restants n'en contiennent pas davantage; par contre, on retrouve aisément dans les eaux-mères provenant de la préparation de la lysocithine l'excès des acides non saturés dérivés du dédoublement de la lécithine et en quantité égale à ce que laissait prévoir la théorie.

Propriétés biologiques de la lysocithine.

Dissoute dans l'eau, la lysocithine manifeste des propriétés hémolytiques extrêmement intenses. Son action s'exerce indifféremment sur toutes les espèces globulaires et jusqu'aux doses limites où elle peut agir; l'hémolyse est pour ainsi dire instantanée. Elle agit quantitativement en ce sens qu'une dose déterminée de lysocithine ne peut détruire qu'une quantité fixe de globules. Ce phénomène est particulièrement net lorsqu'on étudie l'action des doses limites. En règle générale, il suffit de 0,008 mg. à 0.01 mg. de lysocithine pour provoquer en 1 à 3 minutes l'hémolyse de 1 centimètre cube d'hématies de cheval à 5 p. 100. L'action de la lysocithine n'est empêchée ni par les sels de calcium ni par le sérum antivenimeux correspondant au venin qui a servi à la libérer. Par contre, elle est facilement inhibée par le cholestérol et si le sérum normal peut empêcher à un certain degré les effets de la lysocithine c'est précisément en raison du cholestérol qu'il renferme. Delezenne et Fourneau ont observé que, dans des conditions d'expériences déterminées, le cholestérol est capable de se fixer à la lysocithine molécule à molécule pour donner naissance à un composé dépourvu d'action hémolytique. Ce composé présente la particularité de retenir l'eau avec la plus grande énergie. Delezenne et Fourneau ont donc suggéré qu'en s'unissant au cholestérol des globules rouges la lysocithine augmenterait dans d'énormes proportions leur coefficient d'imbibition, d'où rupture d'équilibre et hémolyse.

La lysocithine n'est pas un poison uniquement hémolytique; c'est une cytolysine, au sens le plus large du mot, qui détruit les leucocytes, les cellules épithéliales, les cellules des tissus ou des organes. La lysocithine

est toxique aussi bien pour les organes isolés qu'en injections intraveineuses, par exemple sur le cobaye et sur le lapin. En injections sous-cutanées, elle ne détermine que des phénomènes locaux : œdèmes, escarres, nécrose du tissu cellulaire dûs à son action cytolytique générale. Il a, d'ailleurs, été possible à Fourneau et Page (1914) de préparer synthétiquement toute une série d'esters de la choline tels que le stéarylchloréthanol, le palmitylchloréthanol, le caprylylchloréthanol qui n'avaient pas encore été décrits. Delezenne et Mlle Ledebt ont étudié l'action hémolytique comparée de ces différents produits de synthèse. Les chlorures de palmitylcholine et de stéarylcholine qui sont les plus voisins ont un pouvoir hémolytique à peine inférieur à celui de la lysocithine.

La lysocithine, comme nous l'avons déjà dit, peut à son tour être dédoublée par les venins. Pour que cette transformation se produise il est indispensable que le milieu renferme soit de l'humeur aqueuse, soit du liquide céphalo-rachidien, soit le liquide de dialyse du sérum. L'addition d'oxalate de soude au liquide céphalo-rachidien ou à l'humeur aqueuse empêche le phénomène de se produire, et la lysocithine conserve alors son pouvoir hémolytique, même en présence de venin. Ce fait souligne la présence indispensable des sels de calcium. Cependant, les solutions salines artificielles dont la composition se rapproche de très près de celle des milieux naturels que nous venons d'énumérer favorise beaucoup moins la décomposition de la lysocithine par les venins que ces mêmes milieux naturels.

Delezenne et M^lle^ Ledebt font remarquer qu'étant donné la multiplicité des actions diastasiques dont le venin semble être le support, la lysocithine n'est certainement pas la seule substance toxique qui puisse être libérée par l'action d'un venin agissant sur un substrat organique complexe tel que le vitellus de jaune d'œuf. Enfin, dans l'ignorance où nous sommes de la composition chimique exacte des venins, faut-il encore réserver la part qui serait susceptible de revenir à certains poisons définis, comme les glucosides ou les alcaloïdes qu'ils seraient susceptibles de renfermer.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches expérimentales

Introduction

Nos recherches ont consisté à établir de façon précise le pouvoir hémolytique du venin de vipera aspis. *Dans ce but nous avons recherché les influences relatives à la nature des hématies, des sérums, à la concentration en venin, à la concentration en lécithine, à la température, au temps de contact, à l'action du sérum antivenimeux et du cholestérol.*

Nous nous sommes efforcée : d'une part, d'établir et de décrire une technique minutieuse pouvant être facilement reproduite; et, d'autre part, nous avons toujours distingué ce qui s'appliquait à la formation de la lysocithine et ce qui concernait le pouvoir hémolytique de la lysocithine formée.

Nous nous sommes également attachée à souligner les modalités d'action assez différente qui existent suivant que le venin est placé au contact du sérum sanguin ou au contact d'une suspension artificielle de lécithine.

Enfin, pour généraliser cette action cytolytique du venin en dehors des globules rouges du sang des mammifères, nous avons fait appel comme réactif biologique aux larves de batraciens.

CHAPITRE PREMIER.

Technique générale

L'intensité des phénomènes d'hémolyse dépend beaucoup de la technique employée. L'objet de nos recherches étant l'étude des variations du taux de l'hémolyse en fonction de certains facteurs, il était nécessaire de réaliser les hémolyses dans des conditions bien définies.

Nous décrirons donc successivement la préparation de nos réactifs, la technique opératoire proprement dite et, enfin, la méthode utilisée pour chiffrer les hémolyses.

PRÉPARATION DES REACTIFS.

A. — Préparation des suspensions d'hématies.

Il est indispensable pour obtenir des pourcentages d'hémolyse constants de prendre certaines précautions.

En effet, les facteurs qui peuvent influer sont :

a) La façon de recueillir le sang;

b) Le temps écoulé depuis le prélèvement;

c) Les traitements préliminaires subis par les hématies;

d) Le rapport entre le volume des hématies et le volume de la solution saline mis en contact.

Récolte du sang. — Le sang était pris au moment de la saignée sur les animaux sacrifiés aux abattoirs. Par la suite, nous l'avons prélevé à la seringue sur les chevaux du 4e R. A.

Pour éviter la coagulation on aurait pu ajouter diverses substances anticoagulantes; mais l'addition d'éléments étrangers au sang est susceptible de modifier la résistance des hématies. Dans tous les cas, le sang recueilli dans un flacon stérilisé était défibriné à l'aide de billes de verre. Il est prudent de prendre des billes d'un diamètre inférieur à 5 millimètres pour ne pas produire d'hémolyse mécanique.

Temps écoulé depuis le prélèvement. — La mesure de la résistance globulaire d'un sang défibriné fournit des résultats identiques pendant les

quatre ou cinq heures qui suivent son prélèvement. Ensuite la résistance globulaire diminue de plus en plus en raison de l'action hémolytique du vieillissement.

Pratiquement, le sang défibriné n'était conservé que le temps nécessaire pour aller du lieu de prélèvement au laboratoire, c'est-à-dire moins d'une heure.

Traitement préliminaire des hématies. — Le sang défibriné était centrifugé pour séparer les hématies du sérum. Le sérum recueilli était conservé pour certaines expériences. Les hématies étaient alors lavées cinq fois au sérum physiologique à 9 p. 1.000, de façon à les débarrasser de toute trace de plasma sanguin. Au dernier lavage, on ajoutait une quantité de sérum physiologique redonnant le volume primitif du sang centrifugé. C'est ce « sang artificiel » que nous utilisons pour la préparation de nos suspensions d'hématies.

Rapport entre le volume des hématies et le volume de la solution saline mis en contact. — Nous avons utilisé des suspensions d'hématies au 1/20e, réalisées pratiquement en prenant 5 centimètres cubes de « sang artificiel » et en complétant à 100 centimètres cubes avec du sérum physiologique.

Dans nos expériences, 1 centimètre cube de cette suspension était ajouté à 1 centimètre cube de la solution dont on recherchait le pouvoir hémolytique de telle façon que le rapport du volume *Vh* des hématies au volume *Vs* du liquide dans lequel elles baignent soit de l'ordre de 1/400e.

En effet le taux d'une hémolyse, toutes les autres conditions restant les mêmes, diminue lorsque le rapport *Vh*/*Vs* dépasse 1/40e car les composés issus des premiers globules lysés exercent une action protectrice lorsque la concentration de ces composés atteint une valeur notable. Nous nous trouvons donc à l'abri d'une pareille cause d'erreur.

B. — Préparation des suspensions de lécithine.

Nous avons extrait nous-même la lécithine du jaune d'œuf de poule par la méthode suivante :

Dans un flacon contenant 250 centimètres cubes d'acétone nous placions cinq jaunes d'œuf bien débarrassés du blanc. Après agitation, nous laissions deux heures en contact. Le contenu du flacon était alors essoré sur un entonnoir en porcelaine perforé. La poudre était alors reprise par 100 centimètres cubes d'acétone puis essorée à nouveau. Nous répétions deux fois ce traitement et laissions sécher la poudre à l'air.

Le résidu pulvérulent était ensuite traité par 100 centimètres cubes d'alcool à froid; on laissait trois heures en contact, on essorait et on reprenait le résidu par 75 centimètres cubes d'alcool. Après deux extractions semblables on évaporait l'alcool dans le vide.

Le résidu était malaxé avec 50 centimètres cubes d'acétone; la partie insoluble constituant la lécithine était étalée sur une plaque de verre et conservée dans le vide sulfurique.

Nous nous trouvions en possession d'une lécithine certainement encore impure, mais ne possédant, d'une part, aucun pouvoir hémolytique (dans nos conditions expérimentales tout au moins) et, d'autre part, aucune propriété antihémolytique qui puisse être rattachée à la présence de cholestérol dont l'absence de traces dosables avait été vérifiée par la réaction négative de Liebermann.

Comme sérum artificiel nous utilisons le plus fréquemment des suspensions de lécithine au 1/10.000e obtenues de la manière suivante :

Un gramme de lécithine était dissous dans 100 *centimètres cubes d'alcool méthylique et* 1 *centimètre cube de cette solution était dilué à* 100 *centimètres cubes par du sérum physiologique à* 9 *p.* 1.000.

Nous nous étions assurée au préalable que les solutions d'alcool méthylique même au 1/10e n'étaient pas hémolytiques. Cette constatation est d'ailleurs en concordance avec les travaux de Fuhner et Neubauer d'après lesquels le pouvoir hémolytique des alcools augmente avec la teneur en atomes de carbone.

Ces suspensions de lécithine ne restent pas longtemps stables; aussi étaient-elles préparées chaque jour en effectuant les pesées avec une balance sensible au 1/10e de milligramme de façon à avoir des suspensions aussi semblables que possible.

C. — Préparation des solutions de venin.

Nous avons utilisé du venin de *vipera aspis* desséché et conservé depuis plusieurs années dans des conditions qui ont été précédemment indiquées.

Les récoltes des différentes années pouvant présenter quelques différences, par pulvérisation au mortier nous les avons intimement mélangées de manière à obtenir une poudre homogène et qui nous a servi par la suite à préparer nos différentes solutions.

Par pesée à la balance de précision au 1/10e de milligramme on préparait une solution-mère au 1/1.000e dans du sérum physiologique. Par dilution de cette solution-mère, on obtenait ensuite une solution au 1/10.000e, puis au 1/100.000e, enfin au 1/1.000.000e.

Ces solutions de venin s'altèrent rapidement, aussi étaient-elles préparées extemporanément.

TECHNIQUE OPÉRATOIRE.

Dans une série de 8 tubes à hémolyse stérilisés on verse :

a) Dans tous les tubes 0,5 cm³ de suspension de lécithine au 1/10.000e;

b) Dans chacun des tubes, successivement, 0,5 cm³ de solutions de venin de titre régulièrement décroissant, soit pour le tube (1) 0,5 cm³ de solution de venin au 1/1.000e, pour le tube (2) 0,5 cm³ de solution de venin au 1/5.000e et ainsi de suite.

Pratiquement nous utilisons des solutions-mères de venin au 1/1.000e, 1/10.000e, 1/100.000e et 1/1.000.000e. Ainsi pour la réalisation des tubes (1) et (2) nous versions avec la pipette compte-gouttes : dans le tube (1) 10 gouttes de la solution de venin au 1/1.000e ; dans le tube (2) 2 gouttes de cette même solution de venin au 1/1.000e en complétant à 10 par l'addition de 8 gouttes de sérum physiologique.

Chaque gamme comprend, en outre, un tube-témoin renfermant 0,5 cm³ de suspension de lécithine et 0,5 cm³ de sérum physiologique.

Après agitation pour homogénéiser, les tubes sont placés pendant une heure au bain-marie à 37° pour favoriser la production de la lysocithine. Nous avons préféré l'emploi de ce dispositif à celui d'une étuve qui présente des variations notables de température en ses différents points.

A la sortie du bain-marie on verse dans chaque tube 1 centimètre cube de la suspension d'hématies au 1/20e. On homogénéise et on porte les tubes dans un bain de glace fondante. Après 30 minutes, les tubes sont centrifugés et on note les hémolyses.

MESURE DES TAUX D'HÉMOLYSE.

Nos mesures sont faites par la méthode colorimétrique comparativement à une gamme où par convention l'hémolyse totale est chiffrée 8.

Nous obtenons l'hémolyse totale en ajoutant à un volume donné d'eau distillée le même volume de la suspension d'hématies au 1/20e, de manière à être dans les mêmes conditions que dans nos expériences où à 1 centimètre cube du mélange venin-lécithine nous ajoutons 1 centimètre cube de la suspension d'hématies.

Dans une série de huit tubes identiques à ceux de nos expériences nous plaçons dans le tube (8) 2 centimètres cubes, soit 40 gouttes de la solution totalement hémolysée. On conçoit, dès lors, qu'il suffit d'ajouter dans chacun des autres tubes des quantités régulièrement croissantes de la solution totalement hémolysée et de compléter chaque tube à 2 centimètres cubes par des quantités progressivement décroissantes d'eau distillée dans les proportions suivantes :

Tubes.	Nombre de gouttes de solution d'hémolyse totale.	Nombre de gouttes d'eau.	Fraction de l'hémolyse totale.
1	5	35	1/8e
2	10	30	2/8es
3	15	25	3/8es
4	20	20	4/8es
5	25	15	5/8es
6	30	10	6/8es
7	35	5	7/8es
8	40	0	8/8es

Cette méthode présente l'avantage d'utiliser comme étalon colorimétrique le sang même dont on mesure la résistance. Si l'on employait une gamme colorée une fois pour toutes on serait obligé de tenir compte de la richesse en hémoglobine du sang.

Cette méthode n'est pourtant pas exempte de critique; elle n'est pas, en effet, d'une exactitude rigoureuse. Notre échelle est graduée de 1/8e en 1/8e et il arrive que la teinte de l'un des tubes en expérience soit intermédiaire à celle de deux tubes de l'échelle. Dans ce cas nous attribuons systématiquement à ce tube une valeur moyenne; tout tube, par exemple, dont la teinte est comprise entre celle des tubes 3 et 4 de la gamme est chiffré 3,5.

D'autre part, il est difficile d'apprécier colorimétriquement l'hémolyse totale. En effet, les tubes renfermant plus de 80 p. 100 d'hématies laquées présentent sensiblement la teinte de l'hémolyse totale. La détermination systématique de l'hémolyse totale exige donc l'examen de l'aspect microscopique du dépôt. Malheureusement les divers auteurs ne sont pas toujours d'accord, car c'est un élément d'une appréciation plus délicate que la couleur de la solution. Pour Ribière l'hémolyse est totale lorsqu'on n'obtient après centrifugation, puis agitation, aucun trouble du liquide surnageant.

Brulé, Chauffard et Rendu considèrent que l'hémolyse est totale lorsque le culot des globules rouges devient invisible au fond des tubes. Cependant leurs résultats présentent des différences sensibles puisque là où Ribière note l'hémolyse totale à 35, Chauffard et Rendu la reportent jusqu'au tube 8 à 16. May prétend que les tubes à hémolyse partielle sont séparés des tubes à hémolyse très avancée par un tube où le culot n'est plus rouge compact, mais se présente sous forme d'une couronne dont le centre est vide de tout dépôt. Cet aspect, nommé par l'auteur « stade annulaire », peut servir de repère. En les observant sur fond blanc les tubes en deça présentent encore un léger dépôt qui disparaît un peu plus tard; l'hémolyse peut alors être dite totale.

Nous ne nous sommes pas spécialement attachée à l'étude de l'hémolyse totale. Nos mesures ont toujours été faites dans les mêmes conditions et nous avons simplement tenu compte des données colorimétriques.

Toutefois, dans la réalisation de nos gammes, il n'a pas toujours été possible, notamment dans le cas des hématies de cobaye, d'obtenir l'hémolyse totale par l'eau distillée. Nous avons eu recours à une solution de saponine au 1/5.000e. Cette solution de saponine était elle-même insuffisante pour laquer complètement les hématies de vipère.

CHAPITRE II.

Nature des hématies

Toutes les autres conditions restant égales, par ailleurs, le seul facteur qui change, au cours de ces expériences, est la nature des hématies.

Les tableaux ci-dessous donnent les taux d'hémolyse obtenus pour diverses espèces animales; les tubes A, B, etc., renferment des quantités régulièrement décroissantes de venin, soit 0,5 cm³ de solution de venin au 1/1.000ᵉ pour *le tube A*, 0,5 cm³ de solution de venin au 1/5.000ᵉ pour *le tube B*, etc.

TABLEAU 1.

VEAU.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	4	2,5	0	0	0	0
Exp. 2.....	2	0	0	0	0	0
Exp. 3.....	6	2	1	0	0	0
Exp. 4.....	7	6	5,5	3	0	0
Exp. 5.....	5	2	0	0	0	0
Exp. 6.....	6	3,5	2	0	0	0
Exp. 7.....	3	2	1	0	0	0
Exp. 8.....	5,5	3,5	2	0	0	0
Moyenne.....	4,8	2,7	1,4	0,3	0	0

TABLEAU 2.

MOUTON.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	8	5	1	0	0	0
Exp. 2.....	7.5	4	2	0	0	0
Exp. 3.....	4,5	1,5	0	0	0	0
Exp. 4.....	5,5	2	0.5	0	0	0
Exp. 5.....	7	4	2.5	0	0	0
Exp. 6.....	6	5	2	0	0	0
Exp. 7.....	7	6	5	2,5	0	0
Exp. 8.....	4	1	0,5	0	0	0
Exp. 9.....	3	2,5	2.5	0,5	0	0
Moyenne.....	5,8	3,4	1,8	0,3	0	0

TABLEAU 3.

BŒUF.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	5	4.5	1	0	0	0
Exp. 2.....	8	6,5	5	2	0	0
Exp. 3.....	6	2	0	0	0	0
Exp. 4.....	8	7	3,5	1	0	0
Exp. 5.....	8	7	5,5	2	0	0
Exp. 6.....	7	2	1	0	0	0
Exp. 7.....	4	3,5	1,5	0	0	0
Exp 8.....	8	7.5	7	3	0	0
Moyenne.....	6,7	5	3	1	0	0

TABLEAU 4.

HOMME.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	6,5	3,5	2.5	0	0	0
Exp. 2.....	6.5	4,5	traces.	0	0	0
Exp. 3.....	7,5	7	5	0	0	0
Moyenne.....	6,8	5	2,5	0	0	0

TABLEAU 5.

CHEVAL.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	7.5	7	7	5	3	0
Exp. 2.....	8	6,5	4,5	2	0	0
Exp. 3.....	7	6	5	2	0	0
Exp. 4.....	7	7	5	3,5	2	0
Exp. 5.....	7	6	5	0	0	0
Exp. 6.....	7.5	6,5	5.5	2	0	0
Moyenne.....	7,4	6,5	5,3	2,4	1	0

TABLEAU 6.

COBAYE.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	8	7	6.5	3.5	1	0
Exp. 2.....	8	7.5	7.5	4	1.5	0
Exp. 3.....	8	7.5	7	3.5	1	0
Exp. 4.....	7.5	6	2.5	0	0	0
Exp. 5.....	6	5	4	1	0	0
Exp. 6.....	6.5	5	2.5	0	0	0
Exp. 7.....	8	8	7	4.5	2	0
Exp. 8.....	8	8	6	4	1,5	0
Moyenne.....	7.5	6.7	5.3	2,5	0,9	0

TABLEAU 7.

PORC.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	8	7	5	3	1	0
Exp. 2.....	8	8	7	3,5	2	0
Exp. 3.....	8	7.5	5	2	0	0
Exp. 4.....	8	7	6	3.5	1	0
Exp. 5.....	8	7	5.5	2,5	1	0
Exp. 6.....	8	8	7	5	3	0
Moyenne.....	8	7,4	5.9	3,2	1,3	0

TABLEAU 8.

VIPÈRE.						
TUBES.	A	B	C	D	E	T
Exp. 1.....	3 à 4	3 à 4	0	0	0	0
Exp. 2.....	4 à 5	4 à 5	0	0	0	0
Exp. 3.....	0	0	0	0	0	0
Exp. 4.....	0	0	0	0	0	0
Exp. 5.....	0	0	0	0	0	0

Les deux premières expériences ont été effectuées sur des vipères capturées de façon précoce aussitôt après la période hivernale (mars) et il y a eu légère hémolyse pour les fortes concentrations de venin.

Nous croyons devoir rapprocher ce fait des phénomènes suivants :

1° Le venin des vipères capturées en novembre est moins actif que celui des vipères capturées en avril et le sang des vipères capturées en avril est moins toxique que celui des vipères capturées en novembre.

2° Le sang des vipères capturées en mars et avril est moins riche en hématies (500.000 à 850.000) que celui des vipères capturées de juin à septembre (1.000.000 à 1.150.000).

Il y aurait donc là un ensemble d'observations concordantes permettant de décrire un véritable cycle saisonnier dans la composition du sang des vipères.

On ne peut manquer de s'étonner des grandes différences que présentent entre eux les individus d'une même espèce animale. On ne saurait imputer cependant ces variations aux légères différences qui auraient pu exister entre les solutions-réactifs préparées chaque jour. En effet, beaucoup de nos résultats ont été obtenus en traitant le même jour avec les mêmes solutions deux animaux de même espèce (2 veaux, 2 moutons, 2 bœufs) présentant sensiblement même poids et même âge et, parfois même, provenant d'un même troupeau.

Notre classification repose donc sur les valeurs moyennes de nos résultats. Pour en diminuer l'arbitraire il eût été préférable d'opérer sur un plus grand nombre de sujets; mais le fonctionnement des abattoirs étant considérablement perturbé par suite des conditions actuelles, il ne nous a pas été possible de réaliser ce désir; néanmoins, nous pensons que ce nombre a été suffisant pour que les moyennes obtenues puissent présenter quelque valeur.

En résumé, en ne tenant compte pour chaque espèce animale que des moyennes obtenues, nos résultats peuvent se condenser dans le tableau suivant :

TABLEAU 9.

TUBES.	A	B	C	D	E
Veau.	4,8	2,7	1,4	0,3	0
Mouton.	5,8	3,4	1,8	0,3	0
Bœuf.	6,7	5	3	1	0
Homme.	6,8	5	2,5	0	0
Cheval.	7 4	6,5	5,3	2 4	1
Cobaye.	7,5	6,7	5,3	2,5	0,9
Porc.	8	7,4	5,9	3,2	1,3

Il nous a paru intéressant de comparer la classification précédente, telle qu'elle ressort de nos expériences, avec quelques autres déjà obtenues au cours d'hémolyses provoquées par différents agents chimiques. On sait, par exemple, d'après Mayer et Schaeffer (1914), que l'ordre de résistance des hématies provenant de différentes espèces vis-à-vis de l'hémolyse par l'eau se présente ainsi par ordre décroissant : poule, chien, cobaye, lapin, bœuf, cheval, porc, rat, mouton.

Fabre et Simonnet en 1926 ont donné comme ordre décroissant de résistance globulaire à l'hypotonie : cobaye, lapin, chien, bœuf, cheval, porc, rat, mouton.

Ils ont souligné que l'ordre de résistance globulaire n'était pas le même en ce qui concerne l'action hémolysante par hypotonie ou l'action photosensibilisatrice de l'hématoporphyrine qui se présente ainsi par ordre décroissant : cobaye, chien, porc, mouton, rat, bœuf, lapin, cheval.

D'après Dodel, en 1929, la résistance des globules rouges de différentes espèces vis-à-vis de la quinine est également variable et l'auteur a indiqué dans l'ordre décroissant : poule, cobaye, mouton, cheval.

Mais, en ce qui nous intéresse, il y a surtout lieu de tenir compte des expériences de Houssay et Negrète (1922) relatives à l'action hémolytique comparative des venins des serpents sud-américains. Ces auteurs ont opéré en présence de lécithine et aboutit à la classification suivante par ordre de résistance décroissante : mouton, chèvre, pigeon, souris, rat, bœuf, homme, poule, cheval, cobaye, chien.

Sans insister outre mesure sur la comparaison d'hémolyses produites par des facteurs aussi variables que l'hypotonie, l'hématoporphyrine, la quinine ou les venins, nous nous contenterons simplement de souligner

que les classifications obtenues dans ces cas sont nettement différentes les unes des autres, comme on pouvait d'ailleurs s'y attendre.

Par contre, nous insisterons sur le fait que les hématies qui ont été étudiées à la fois par Houssay et Negrète, d'une part, en ce qui concerne leur résistance vis-à-vis des venins de serpents sud-américains, et nous-même en ce qui concerne leur résistance vis-à-vis des venins de vipères d'Auvergne, se trouvent rangées dans le même ordre.

Nous pouvons également nous poser la question de savoir s'il existe un certain rapport entre la sensibilité des hématies vis-à-vis du venin telle que nous l'avons établie et leur coefficient lipocytique cholestérol/acides gras dont Mayer et Schaeffer ont souligné, dès 1912, l'importance dans les phénomènes d'hémolyse.

Rappelons que d'après ces auteurs le cholestérol confère aux matières grasses le pouvoir de fixer de l'eau et qu'il permet donc, selon sa teneur relative, au complexe lipo-protéidique cellulaire de s'imbiber plus ou moins. La connaissance des coefficients lipocytiques cholestérol/acides gras et cholestérol/phosphore lipoïdique permettrait ainsi d'évaluer la puissance d'absorption de la cellule vis-à-vis de l'eau. De fait, Mayer et Schaeffer démontrèrent que l'hémolyse par l'eau se produit d'autant plus facilement que le coefficient lipocytique des globules en expérience est plus grand. Ainsi, dans l'exemple de l'ordre de résistance de certains globules vis-à-vis de l'eau, les hématies de mouton qui sont le plus facilement hémolysables ont le coefficient lipocytique le plus fort. Les globules du chien et de la poule qui sont les plus résistants ont les coefficients lipocytiques les plus faibles.

Pour Hamburger, au contraire, le cholestérol augmenterait la résistance à l'hémolyse alors que le lécithine la diminuerait. Des conclusions semblables ont été formulées par Walter Spranger en 1930. Cet auteur a montré que la résistance des globules rouges du mouton contre le passage de l'eau dépend avant tout des colloïdes hydrophiles (albumine, lécithine, oléate de *Na*) et hydrophobes (trioléine, cholestérol et esters). Par contre, Delas, en 1933, pense que la résistance des hématies aux solutions salines hypotoniques varie d'une espèce animale à l'autre et d'un individu à l'autre, indépendamment de la teneur en cholestérol globulaire ou plasmatique. Cependant, chez les animaux à résistance globulaire élevée, Delas souligne que le plasma peut être très pauvre en cholestérol (cobaye, lapin) tandis que les hématies en fixent toujours une proportion assez importante.

Poursuivre cette discussion dans le cas des différents modes d'hémolyse serait évidemment dépasser le cadre du travail que nous nous sommes assigné. Il nous paraît intéressant cependant, étant donné les opinions que nous venons de rappeler, de confronter la résistance des hématies vis-à-vis du venin de vipère avec :

1° Leurs pourcentages en cholestérol qui, par ordre décroissant, sont d'après Mayer et Schaeffer :

Mouton	Porc	Bœuf	Cheval	Cobaye
0,405	0,376	0,359	0,353	0,336

2° Les valeurs de leurs coefficients lipocytiques qui par ordre décroissant se classent de la manière suivante :

Mouton	Bœuf	Cheval	Cobaye	Porc
0,445	0,413	0,410	0,405	0,394

La première classification n'a aucun rapport avec celle que nous avons obtenue. Par contre, la deuxième est justement celle que donnent nos expériences, mais c'est une classification rigoureusement inverse de celle que donne la théorie de Mayer et Schaeffer pour laquelle c'est au plus grand coefficient lipocytique que correspond la résistance globulaire la plus faible, alors qu'ici au coefficient lipocytique le plus élevé correspond la résistance globulaire la plus forte.

La dernière remarque que nous voudrions exprimer consiste à souligner le fait que, ayant mis en contact le venin avec une suspension artificielle de lécithine pendant une heure avant l'adjonction des hématies, celles-ci se sont forcément toutes trouvées en présence de la même quantité d'agent hémolytique, nous voulons dire de la lysocithine. Il est donc évident que la lécithine des hématies n'a pu jouer dans ces conditions qu'un rôle nul ou pratiquement négligeable en ce qui concerne la formation de l'agent hémolytique. Par contre, pour ce qui est de la plus ou moins grande résistance de ces hématies vis-à-vis de la lysocithine préalablement formée il est évident que les différentes teneurs des globules en lécithine ont pu jouer dans la marge où les travaux des différents auteurs lui attribuent ce rôle.

En réalité, les facteurs de résistance globulaire vis-à-vis d'un agent hémolytique donné sont excessivement complexes et, dans le cas de l'hémolyse par les venins comme dans celui de la plupart des agents hémolytiques, il n'est pas encore possible, semble-t-il, d'établir de relation simple entre la constitution chimique des hématies et leur degré de résistance aux différents agents hémolytiques.

CONCLUSIONS.

Dans les conditions qui ont été précisées plus haut la résistance des hématies de différentes espèces vis-à-vis de l'action hémolytique du venin de *vipera aspis* en présence d'une suspension de lécithine se trouve être sensiblement dans l'ordre décroissant suivant : vipère, veau, mouton, bœuf, homme, cheval, cobaye, porc.

CHAPITRE III.

Taux du venin

A. — Cas des suspensions de lécithine.

De toutes les expériences rapportées au précédent chapitre il résulte que toutes les autres conditions restant les mêmes et quelle que soit la nature des hématies, l'hémolyse croît avec la dose de venin, tout au moins dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire jusqu'à une concentration en venin du 1/1.000e.

Ce résultat semble évident; mais il n'en sera plus de même si nous remplaçons les suspensions de lécithine par du sérum.

B. — Cas du sérum.

Suivant la technique précédemment indiquée, 0,5 cm³ de sérum de cheval chauffé une heure à 56° C sont mélangés à 0,5 cm³ de solutions de venin à différents titres. Le mélange est maintenu une heure à une température donnée. Le pouvoir hémolytique du mélange est recherché vis-à-vis des hématies de cheval après un contact d'une demi-heure à la température du laboratoire.

Nous rapportons ci-dessous, à titre d'exemple, quelques-unes des nombreuses expériences qui figurent dans la suite de ce travail.

TABLEAU 10.

TEMPÉRATURE de FORMATION de la lysocithine.	TUBES	A	B	C	D	E	F	G	T
0°.		5,5	6	6,5	3,1	1	0	0	0
20°.		5	5	5,5	6	3,5	0	0	0
37°.		3,5	4	4,5	4	4	2 5	0	0
50°.		4	4	5	4	2	0	0	0

L'examen de ce tableau montre que lorsque la formation de lysocithine résulte non plus de l'action du venin sur une suspension de lécithine, mais bien de l'action du venin sur du sérum, chauffé à 56° C pendant une heure, n'ayant dans nos conditions expérimentales aucune propriété hémolytique et sérum et hématies provenant du même sang, l'hémolyse passe par un maximum pour des concentrations en venin comprises entre 1 p. 10.000 et 1 p. 50.000.

Différents auteurs (Weir-Mitchell, en 1861; puis Stewart, en 1897) sont d'accord sur le fait que l'hémolyse diminue et même s'annule si l'on utilise de fortes doses de venin. Pour ces auteurs l'hémolyse ne survient que s'il y a moins de 10 p. 100 de venin dans le mélange.

Noguchi constate que les suspensions d'hématies de cheval dans le sérum physiologique restent intactes pendant plusieurs semaines avec des concentrations de venin de cobra supérieures à 4 p. 100, alors qu'avec une concentration de 2,5 p. 100 de venin l'hémolyse a lieu en une à deux heures.

D'autre part, Kyes et Sachs constatent que le venin de cobra à forte dose n'hémolyse pas les globules lavés de cheval, même en présence de lécithine ou de sérum chauffé.

Bien plus, les globules qui ont séjourné seulement pendant vingt minutes dans une solution concentrée de venin ne sont plus hémolysables par l'eau pure, les solutions salines, la saponine et la tétanolysine. Par contre, la résistance à la chaleur a diminué. L'action protectrice disparaît quand les globules sont lavés plusieurs fois dans une solution saline et ainsi débarrassés du venin. De tels globules sont alors moins résistants vis-à-vis des solutions de venin ou de saponine que s'ils avaient d'abord séjourné dans une solution plus faible de venin. Les globules de cheval, de rat, de lapin qui peuvent être protégés par le venin fournissent une hémoglobine donnant un précipité avec le venin. Les globules de chien et de cobaye qui ne sont jamais protégés par les solutions fortes de venin ont une hémoglobine qui, dans les mêmes conditions, ne précipite pas avec le venin. D'après Noguchi, la protection exercée par le venin se ramènerait alors à la formation dans les globules d'un composé insoluble dans l'eau.

En résumé, il existe une limite de la dose de venin hémolysante au-dessus de laquelle l'hémolyse décroît au fur et à mesure que croît la dose de venin.

On peut rapprocher de cette action protectrice des fortes doses de venin sur les hématies normalement hémolysées avec des doses moyennes des phénomènes analogues concernant d'autres agents hémolytiques : bichlorure de mercure (Dètre et Sellei), les acides (Madsen et Walbum).

CONCLUSIONS.

Il résulte de nos expériences réalisées avec des teneurs en venin bien inférieures à celles utilisées par les auteurs précédemment

cités que, quelle que soit la nature des hématies (veau, mouton, bœuf, homme, cheval, cobaye, porc), l'hémolyse croît avec la teneur en venin dans le cas des suspensions de lécithine. Au contraire, dans le cas du sérum, il y a toujours un maximum pour des concentrations en venin comprises entre 1 p. 10.000 et 1 p. 50.000.

CHAPITRE IV.

Taux de la lécithine

Technique.

Nous rappelons brièvement le mode opératoire. Dans une série de huit tubes à hémolyse stérilisés on verse :

a) Dans tous les tubes 0,5 cm³ de suspension de lécithine de titre X.

b) Dans chacun des tubes, successivement, 0,5 cm³ de solution de venin de titre régulièrement décroissant, soit, pour le tube (A), 0,5 cm³ de solution de venin au 1/1.000ᵉ, pour le tube (B) 0,5 cm³ de solution de venin au 1/5.000ᵉ et ainsi de suite.

Ces tubes sont maintenus 1 heure à 37° C pour favoriser la formation de la lysocithine.

On ajoute alors dans chaque tube 1 centimètre cube d'une suspension au 1/20ᵉ d'hématies de cobaye. Après un séjour d'une demi-heure à 0° C les tubes sont centrifugés et on note les hémolyses.

Expériences.

Au cours de ces expériences, toutes les autres conditions ci-dessus restant égales par ailleurs, nous faisons varier le taux de la lécithine, utilisant, à cet effet, des suspensions de titre régulièrement décroissant 1/1.000ᵉ, 1/10.000ᵉ, 1/100.000ᵉ, 1/1.000.000ᵉ.

L'ensemble de nos résultats est condensé dans le tableau 11.

TABLEAU 11.

SUSPENSIONS DE LÉCITHINE A 1 p. 100 D'ALCOOL MÉTHYLIQUE.

(*Test hématies de cobaye.*)

	TUBES.	A	B	C	D	E	T
	CONCENTRATIONS des suspensions de lécithine.						
Exp. 1.....	10-3	8	8	8	5	1,5	0
	10-4	8	8	8	7	6,5	0
	10-5	7,5	2,5	0	0	0	0
	10-6	2	traces.	0	0	0	0
Exp. 2.....	10-3	8	8	8	4	0	0
	10-4	8	8	8	5	1	0
	10-5	2,5	1	0,5	0	0	0
	10-6	0,5	0	0	0	0	0
Exp. 3.....	10-3	8	8	7,5	5	1,5	0
	10-4	8	8	8	7,5	7,5	0
	10-5	5	1	traces.	0	0	0
	10-6	traces.	traces.	0	0	0	0

Les suspensions de lécithine utilisées sont des suspensions contenant 1 p. 100 d'alcool méthylique obtenues de la façon suivante : un gramme de lécithine est dissous dans 100 centimètres cubes d'alcool méthylique et 1 centimètre cube de cette solution est complété à 100 centimètres cubes par du sérum physiologique.

Ces suspensions de lécithine sont nettement opalescentes. Pour augmenter la quantité de lécithine dissoute nous avons préparé des suspensions à 10 p. 100 d'alcool méthylique.

Les expériences ont été reprises avec les suspensions de lécithine à 10 p. 100 d'alcool après nous être préalablement assurée que les solutions d'alcool méthylique au 1/10^{e} n'étaient pas hémolytiques dans nos conditions expérimentales.

Le tableau 12 résume l'ensemble de nos résultats.

TABLEAU 12.

SUSPENSIONS DE LÉCITHINE A 10 p. 100
D'ALCOOL MÉTHYLIQUE.

(*Test hématies de cobaye.*)

	TUBES.	A	B	C	D	E	F	G	T
	CONCENTRATIONS des suspensions de lécithine.								
Exp. 1....	10-3	8	8	8	8	6	traces.		0
	10-4	8	8	8	8	8	6		0
	10-5	5,5	3	1	0	0	0		0
	10-6	4	0	0	0	0	0		0
Exp. 2....	10-3	8	8	8	8	8	8	2	0
	10-4	8	8	8	8	8	8	2,5	0
	10-5	7,5	4	2	traces.	traces.	0	0	0
	10-6	4	0	0	0	0	0	0	0

La lecture de ces deux tableaux nous conduit aux mêmes conclusions. Quel que soit le titre alcoolique des suspensions de lécithine, nous obtenons des résultats analogues.

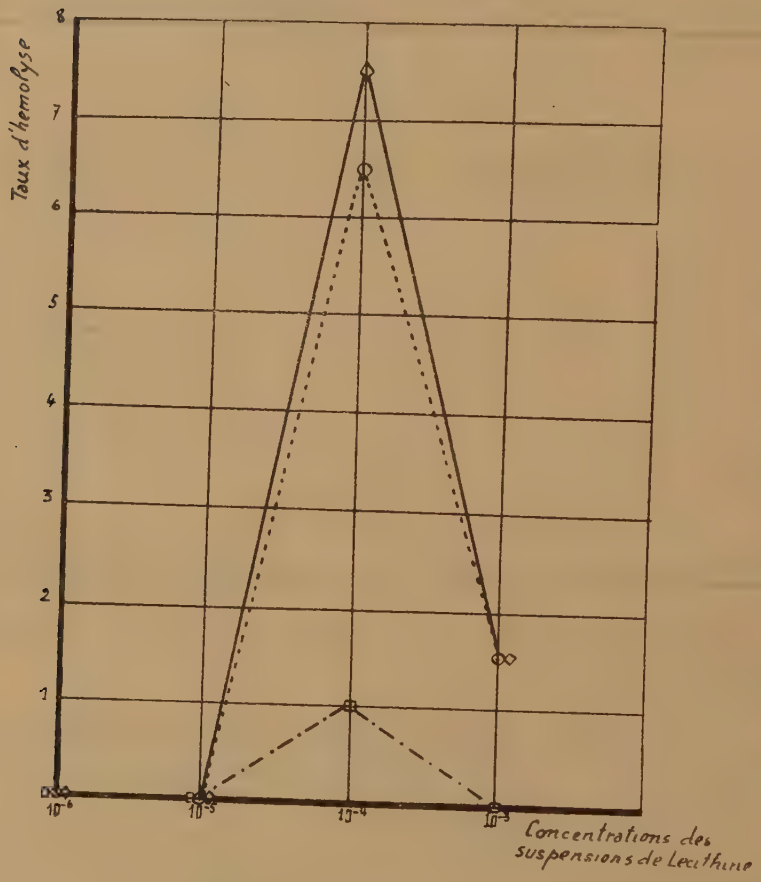
Toutes les autres conditions restant égales, si nous faisons varier le taux des suspensions de lécithine de 1 p. 1.000 à 1 p. 1.000.000, le pouvoir hémolytique passe par un optimum pour une concentration de 1 p. 10.000.

Ce phénomène est particulièrement net pour des concentrations relativement faibles en venin. Les courbes de la page 58 donnent les variations du taux de l'hémolyse en fonction des concentrations de lécithine pour une concentration de venin du 1/100.000e (tube E).

Pour les fortes concentrations de venin, le maximum d'hémolyse semble atteint d'emblée; et l'on assiste simplement à la partie décroissante de la courbe.

Rappelons à ce propos qu'en 1922 Houssay et Negrète, étudiant l'action hémolytique comparative des venins de serpents sud-américains, signalaient qu'un excès de lécithine (suspension à 50 p. 100) pouvait empêcher l'hémolyse.

Courbes des variations de l'hémolyse en fonction des concentrations de lécithine pour une même concentration de venin (tube E).



La dernière question qui se pose est celle qui a trait au cas particulier où l'on ne place au contact du venin aucune trace de lécithine : c'est le cas de la teneur zéro en lécithine.

Cette question a été envisagée depuis longtemps, dès le début des études sur l'hémolyse produite par les venins. Kyes, en 1902, a montré que vis-à-vis du venin de cobra on pouvait distinguer deux sortes d'hématies :

1° Celles qui, après lavage dans une solution isotonique de NaCl, sont directement hémolysables par le venin, sans addition de sérum : homme, cheval, chien, lapin, cobaye;

2° Celles qui ne peuvent être hémolysées par aucune concentration de venin en l'absence de complément sérum ou lécithine : bœuf, mouton, chèvre.

En ce qui nous concerne, nous avons essayé l'action de la dose maxima de venin 1/1.000e employée dans toutes nos expériences, vis-à-vis des hématies déjà étudiées, mais en l'absence de lécithine. Nous avons constaté qu'il n'y avait pas d'hémolyse avec les hématies de veau, mouton, bœuf, homme, cheval, porc et qu'avec les hématies de cobaye nous avions des traces d'hémolyse inférieures à 1.

CONCLUSIONS.

Lorsque le taux de la lécithine croît, l'hémolyse augmente et passe par un maximum pour une teneur en lécithine du 1/10.000e. L'existence de ce maximum est particulièrement nette pour les faibles teneurs en venin. Quand le taux de la lécithine tombe à zéro, de toutes les hématies essayées (veau, mouton, bœuf, homme, cheval, cobaye, porc) seules celles de cobaye fournissent une hémolyse d'ailleurs très légèrement inférieure à 1.

CHAPITRE V.

Température

Nos expériences se trouvent naturellement divisées en deux séries : les premières consacrées à l'étude de l'influence de la température sur la formation de la lysocithine, les secondes à l'étude du pouvoir hémolytique de la lysocithine formée en fonction de la température.

1° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA FORMATION DE LA LYSOCITHINE.

Nous avons deux cas à considérer : celui du mélange venin-lécithine et celui du mélange venin-sérum.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

Comme nous l'avons indiqué au précédent chapitre, le taux de lécithine le plus favorable étant celui du 1/10.000e nous avons utilisé au cours de ces expériences des suspensions de lécithine au 1/10.000e. Dans une première série d'expériences le mélange venin-lécithine est maintenu pendant une heure à 0° C, dans une deuxième série une heure à 20° C, dans une troisième série une heure à 37° C.

Nous faisons la convention d'admettre que la quantité de lysocithine formée dans chacun des tubes est proportionnelle au pouvoir hémolytique de ce mélange.

Pour apprécier le pouvoir hémolytique nous faisons agir le mélange sur une suspension d'hématies de cobaye au 1/20e dans une première série d'expériences pendant une demi-heure à 0° C, dans une deuxième série pendant une demi-heure à 37° C.

Nos résultats sont condensés dans les tableaux 13 et 14.

TABLEAUX 13 *et* 14.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

1° *Test hématies de cobaye.*

	HÉMOLYSE A 0°.							
	TEMPÉRATURE DE FORMATION de la lysocithine.	TUBES	A	B	C	D	E	T
Exp. 1...	0°		3,5	1	0	0	0	0
	20°		5	1	0	0	0	0
	37°		7,5	6	2,5	0	0	0
Exp. 2...	0°		3	1,5	0	0	0	0
	20°		4	2	0	0	0	0
	37°		5	4	1	0	0	0
Exp. 3...	0°		2,5	traces.	0	0	0	0
	20°		4,5	2,5	0	0	0	0
	37°		6,5	5	2,5	0	0	0

	HÉMOLYSE A 37°.								
	TEMPÉRATURE DE FORMATION de la lysocithine.	TUBES	A	B	C	D	E	F	T
Exp. 1...	0°		8	8	5,5	4	1	0	0
	20°		8	8	8	4	1	0	0
	37°		8	8	8	6,5	2,5	0	0
Exp. 2...	0°		8	8	7,5	3,5	0	0	0
	20°		8	8	8	4	0,5	0	0
	37°		8	8	8	8	1	0	0
Exp. 3...	0°		8	8	8	2	0	0	0
	20°		8	8	8	3,5	1	0	0
	37°		8	8	8	4	1	0	0

De la lecture des tableaux 13 et 14 il ressort qu'en faisant agir le venin de vipère sur une suspension de lécithine, toutes conditions restant égales par ailleurs, sauf la température à laquelle se trouve porté le mélange venin-lécithine, et, en appréciant ce pouvoir hémolytique sur des hématies de cobaye, on trouve que, quelle que soit la température d'hémolyse, le pouvoir hémolytique du mélange varie dans le même sens que la température d'action du venin sur la lécithine.

En résumé, selon notre convention, la quantité de lysocithine formée est plus grande à 37° C qu'à 20° C elle-même plus grande qu'à 0° C.

Encouragée par cette action favorisante de la température, nous avons soumis nos mélanges à des températures de plus en plus élevées.

Nous avons pris alors comme test des hématies de cheval car nous proposant d'étudier parallèlement l'action de la température sur le mélange venin-sérum, il ne nous aurait pas été possible de nous procurer des quantités suffisantes de sérum de cobaye.

Pour les températures supérieures à 37° C les tubes contenant le mélange venin-lécithine étaient bouchés pour éviter toute évaporation. Pour les températures supérieures à 70° C l'eau de bain-marie était remplacée par de l'huile pour éviter que la condensation de la vapeur d'eau ne produise une hémolyse.

Le tableau 15 donne l'ensemble de nos résultats.

TABLEAU 15.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

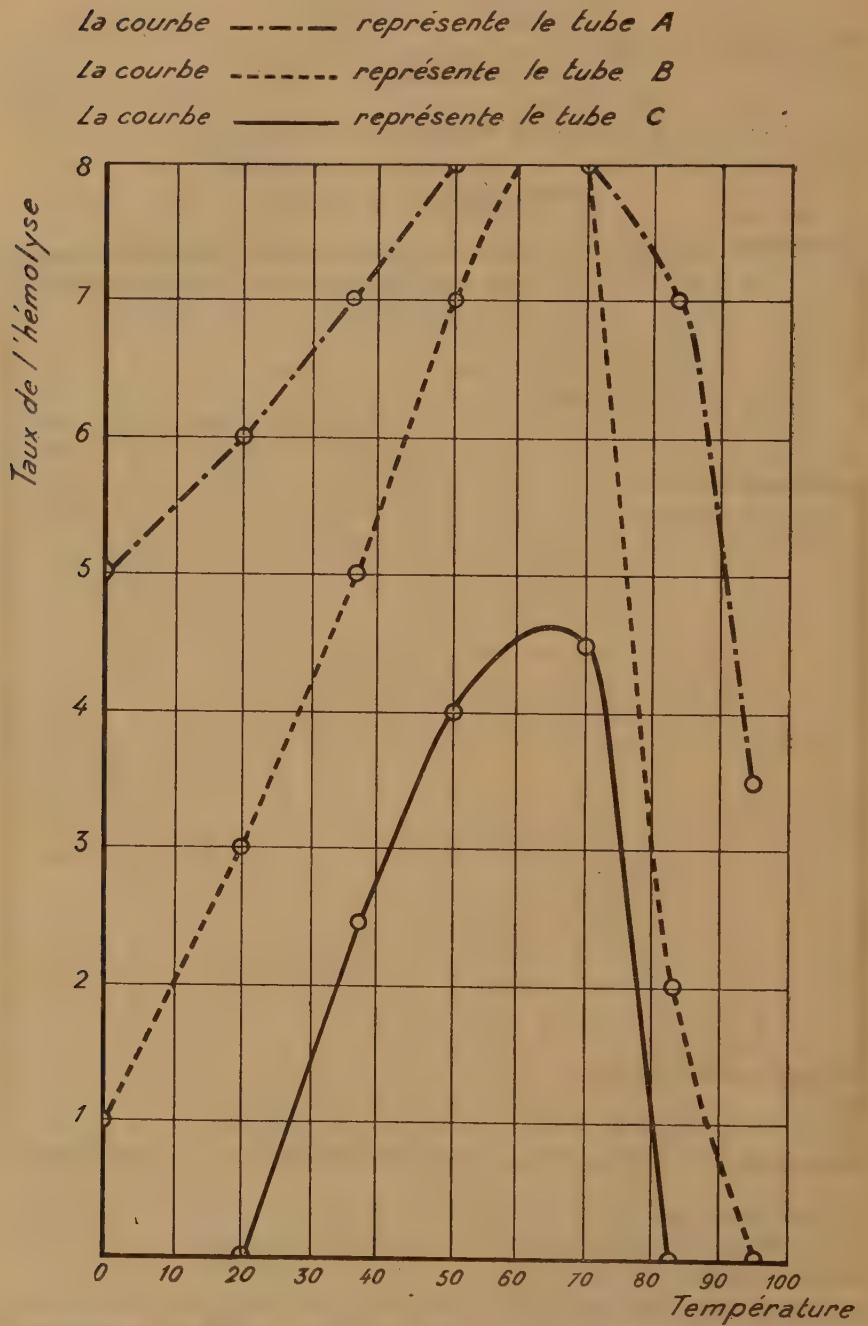
2° Test hématies de cheval.

	HÉMOLYSE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE (24°).						
	TEMPÉRATURE DE FORMATION de la lysocithine.	TUBES	A	B	C	D	T
Exp. 1.....	0°		3,5	0	0	0	0
	20°		4	1	0	0	0
	37°		4,5	2	0	0	0
	50°		5	3,5	3	0	0
	70°		6	4	3	0	0
Exp. 2.....	50°		5	3	1	0	0
	65°		5	4	2	0	0
	85°		5	2,5	1	traces.	0
	94°		3	0	0	0	0
Exp. 3.....	0°		5	1	0	0	0
	20°		6	3	0	0	0
	37°		7	5	2,5	0	0
	50°		8	7	4	0	0
	70°		8	8	4,5	0	0
	83°		7	2	0	0	0
	94°		3,5	0	0	0	0

La formation de la lysocithine croît de façon régulière jusqu'aux environs de 65° à 70° C pour décroître ensuite de façon assez rapide et tendre vers 0 pour une température voisine de 95° C.

Les courbes de la page 64 donnent clairement l'allure du phénomène.

Variations du taux de l'hémolyse en fonction de la température de formation de la lysocithine.



En extrapolant les courbes relatives aux tubes A et B au delà d'un taux d'hémolyse égal à 8, on constate que toutes trois présentent des maxima se trouvant sur une même verticale comprise entre 65 et 70° C.

B. — Cas du sérum.

Des expériences analogues ont été faites en substituant du sérum aux suspensions de lécithine. Mais dans ce cas il n'est pas possible de soumettre le mélange venin-sérum à des températures supérieures à 70° C car il y a à ce moment coagulation du sérum.

Le tableau 16 résume l'ensemble des expériences :

TABLEAU 16.

B. — Cas du sérum.

Test hématies de cheval.

	HÉMOLYSE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE (24°).									
	TEMPÉRATURE DE LA FORMATION de la lyscithine.	TUBES	A	B	C	D	E	F	G	T
Exp. 1.	0°		5,5	6	6 5	3,5	1	0	0	0
	20°		5	5	5,5	6	3,5	0	0	0
	37°		3,5	4	4,5	4	4	2,5	0	0
	50°		2,5	3,5	4	5	4	3,5	1,5	0
	70° (coagulé)		4	4	5	4	2	0	0	0
Exp. 2.	20°		4,5	5	5	4,5	0	0	0	0
	37°		3,5	4,5	5	4	3	0	0	0
	50°		1	3	3,5	3.5	3,5	3 5	1	0
	65°		2	3	4	4	3	0	0	0

A la lecture de ce tableau il semble qu'on ne puisse pas dégager de façon nette une influence de la température dans ce cas particulier. En effet, pour les fortes concentrations en venin (tubes A, B, C) nous voyons que la formation de lysocithine varie en sens inverse de la température (de 0 à 50°). Au contraire, pour les faibles concentrations en venin, notamment tubes E et F, la quantité de lysocithine formée est d'autant plus grande que la température est plus élevée.

Cesari et Boquet, en 1935, concluaient d'expériences analogues que la

formation de lysocithine dans le mélange de venin-sérum s'opérait beaucoup mieux à 37° C qu'à 0° C.

CONCLUSIONS.

L'existence d'un optimum de température très net dans l'action du venin sur la lécithine vient à l'appui du caractère diastasique qu'il est classique depuis Delezenne et M^lle^ Ledebt d'attribuer à l'action des venins.

2° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LE POUVOIR HÉMOLYTIQUE DE LA LYSOCITHINE.

Nous considérerons maintenant le cas où le mélange venin-lécithine ou venin-sérum a toujours été porté avant l'appréciation de son pouvoir hémolytique à la même température. On recherche ensuite l'action de la température sur le pouvoir hémolytique des mélanges, c'est-à-dire l'influence de la température sur le pouvoir hémolytique de la lysocithine formée.

Comme précédemment, nous avons deux cas à considérer : lysocithine résultant du mélange venin-lécithine et lysocithine résultant du mélange venin-sérum.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

1° Test hématies de cobaye.

Dans toutes les expériences qui vont suivre la température de 37° C n'a pas été dépassée pour être nettement à l'abri des effets destructeurs de la chaleur sur les hématies.

Dans une première série d'expériences nous soumettons le mélange venin-lécithine pendant une heure à la température de 37° C. Nous éprouvons alors le pouvoir hémolytique du mélange à différentes températures 0° C, 20° C, 37° C.

Nous faisons une deuxième série d'expériences en éprouvant encore à 0° C, 20° C, 37° C le pouvoir hémolytique d'un mélange soumis pendant une heure à 0° C.

Les résultats obtenus figurent aux tableaux 17 et 18.

TABLEAUX 17 *et* 18.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

1° *Test hématies de cobaye.*

	FORMATION DE LA LYSOCITHINE A 37°.							
	TEMPÉRATURE D'ACTION de la lysocithine.	TUBES	A	B	C	D	E	T
Exp. 1...	0°		7,5	6	2,5	0	0	0
	20°		7,5	7,5	3,5	0	0	0
	37°		8	8	8	4	1	0
Exp. 2...	0°		5	4	1	0	0	0
	20°		7	4,5	4	1	0	0
	37°		8	8	8	5	2	0
Exp. 3...	0°		6,5	5	2,5	0	0	0
	20°		8	5,5	4	1	0	0
	37°		8	8	8	6,5	2,5	0

	FORMATION DE LA LYSOCITHINE A 0°.							
	TEMPÉRATURE D'ACTION de la lysocithine.	TUBES	A	B	C	D	E	T
Exp. 4...	0°		3,5	1	0	0	0	0
	20°		6	3	1	0	0	0
	37°		8	8	8	2	0	0
Exp. 5...	0°		3	1,5	0	0	0	0
	20°		6	3,5	1	0	0	0
	37°		8	8	7,5	3,5	1	0
Exp. 6...	0°		2,5	traces.	0	0	0	0
	20°		5	2	1	0	0	0
	37°		8	8	5,5	4	1	0

De la lecture de ces deux tableaux il ressort que quelle que soit la température de formation de la lysocithine le pouvoir hémolytique de la lysocithine formée, lorsqu'on prend pour test les hématies de cobaye, varie dans le même sens que la température, c'est-à-dire que le pouvoir hémolytique recherché est plus grand à 37° C qu'à 20° C, lui-même plus grand qu'à 0° C, et cela quelle que soit la concentration en venin.

2° Test hématies de cheval.

En reprenant cette étude avec les hématies de cheval on constate que quelle que soit la température de formation de la lysocithine le pouvoir hémolytique de la lysocithine formée n'est plus une fonction croissante de la température comme pour les hématies de cobaye mais présente un minimum à la température de 20° C. Les tableaux 19, 20, 21 rendent compte de cet effet.

TABLEAUX 19, 20 *et* 21.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

2° *Test hématies de cheval.*

	FORMATION DE LYSOCITHINE A 37°.						
	TEMPÉRATURE D'ACTION de la lysocithine.	TUBES.	A	B	C	D	T
Exp. 1....	0°		7	6	5	0	0
	20°		5,5	4,5	1	0	0
	37°		7	7	6,5	0	0
Exp. 2....	0°		5	4	4	0	0
	20°		3,5	1	0	0	0
	37°		5	2,5	1	0	0

	FORMATION DE LA LYSOCITHINE A 20°.						
	TEMPÉRATURE D'ACTION de la lysocithine.	TUBES.	A	B	C	D	T
Exp. 3....	0°		3	0	0	0	0
	20°		3	0	0	0	0
	37°		7	4	1	0	0

	FORMATION DE LA LYSOCITHINE A 0°.						
	TEMPÉRATURE D'ACTION de la lysocithine.	TUBES.	A	B	C	D	T
Exp. 4....	0°		4,5	0	0	0	0
	20°		3,5	0	0	0	0
	37°		7,5	6,5	3,5	0	0

B. — Cas du sérum.

Nous examinons le cas où le sérum est laissé au contact du venin pendant une heure à différentes températures. Dans toutes ces expériences il s'agit de sérum et d'hématies de cheval, car avec le cobaye nous n'aurions pas eu une quantité de sérum suffisante.

Quelle que soit la température de formation de la lysocithine le pouvoir hémolytique de la lysocithine formée varie en sens inverse de la température, comme l'indiquent les tableaux 22 et 23.

TABLEAUX 22 et 23.

B. — Cas du sérum.

Test hématies de cheval.

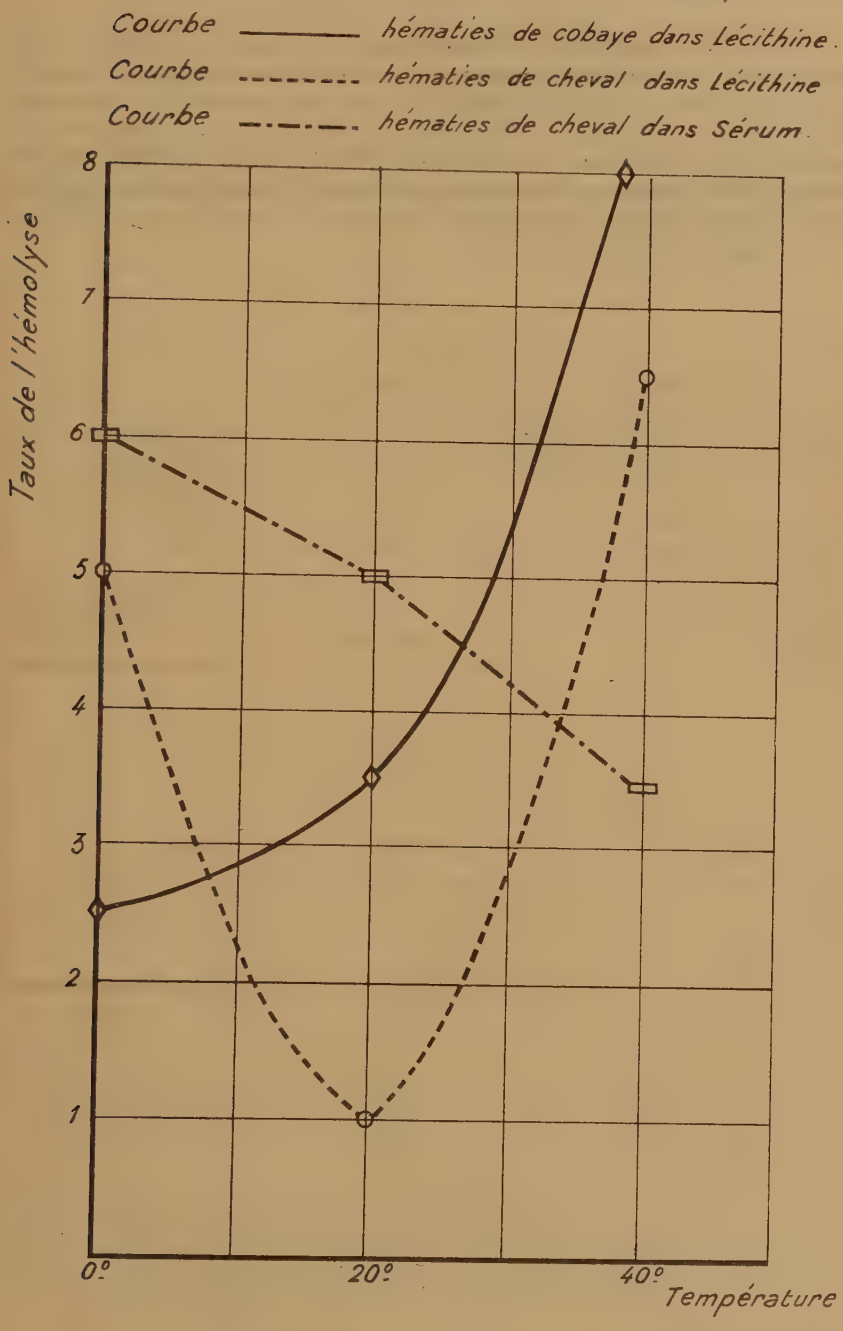
	FORMATION DE LA LYSOCITHINE A 37°.									
	TEMPÉRATURE D'ACTION de la lysocithine.	TUBES	A	B	O	D	E	F	G	T
Exp. 1.	0°		6	6	6,5	7	7	5	1,5	0
	20°		2,5	4	4,5	5	5	0	0	0
	37°		1	3	4,5	5	5	0	0	0
Exp. 2.	0°		6	6	6	6	6	6	3	0
	20°		4,5	5	5	5	5	0	0	0
	37°		2	3	3,5	3,5	3,5	0	0	0

	FORMATION DE LA LYSOCITHINE A 20°.									
	TEMPÉRATURE D'ACTION de la lysocithine.	TUBES	A	B	C	D	E	F	G	T
Exp. 3.	0°		6	7	7	7	5	0	0	0
	20°		6	6	6	6	2,5	0	0	0
	37°		6	6	6	4	1,5	0	0	0

Ce dernier cas avait déjà été envisagé par Cesari et Boquet en 1935 et ces auteurs avaient conclu dans le même sens.

Nous n'avons pas osé dépasser la température de 37° C, craignant que les hématies subissent un commencement d'altération qui, quoique inapparent, eût été capable de faciliter l'hémolyse.

Courbes des variations du taux d'hémolyse en fonction de la température à laquelle agit la lysocithine.
(Courbes relatives à la concentration en venin du tube C.)



CONCLUSIONS.

Pour les hématies de cobaye et en présence de lécithine, l'hémolyse est d'autant plus importante qu'elle se produit à une température plus élevée (de 0° C à 37° C) ; pour les hématies de cheval et en présence de lécithine, l'hémolyse ne croît pas proportionnellement à la température (minimum à 20° C) ; pour les hématies de cheval, et en présence de sérum de cheval, l'hémolyse est d'autant plus importante que la température est plus basse (de 0 à 37° C).

(Voir courbes page 71.)

CHAPITRE VI.

Temps de contact

1° INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT SUR LA FORMATION DE LA LYSOCITHINE.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

Selon la technique habituelle, des suspensions de lécithine et des solutions de venin de titre régulièrement décroissant sont laissées en contact des temps variant entre 15 minutes et 7 heures. Nous éprouvons le pouvoir hémolytique de ces mélanges vis-à-vis d'hématies de cheval avec la convention que le pouvoir hémolytique de ces mélanges est proportionnel à la quantité de lysocithine formée.

Il résulte de nos expériences résumées aux tableaux 24 et 25 que, quelle que soit la température de l'expérience, la quantité de lysocithine formée est proportionnelle au temps de contact; toutefois, après cinq heures, et pour les fortes teneurs en venin tout au moins, une augmentation du temps de contact ne détermine pas une augmentation appréciable de lysocithine.

TABLEAUX 24 et 25.

A. — MÉLANGE VENIN-LÉCITHINE.

Test hématies de cheval.

FORMATION DE LYSOCITHINE A 25° C PENDANT :	TUBES	A	B	C	D	T
1/4 heure.		2,5	traces.	0		0
1/2 heure.		3	traces.	0		0
1 heure.		3	0,5	0		0
3 heures.		3,5	1	0		0
5 heures.		4	1,5	traces.	0	0
7 heures.		4	2,5	0,5	0	0

FORMATION DE LYSOCITHINE à 50° C pendant :	TUBES	A	B	C	D	E	T
1 heure.		5	5	3,5	0	0	0
5 heures.		6	5,5	5	2	0	0
7 heures.		6	6	6	1	0	0

B. — Cas du sérum.

Le venin est placé non plus au contact de la lécithine mais au contact du sérum provenant du même animal que les hématies. Ce sérum a été chauffé à 56° C, et, dans nos conditions expérimentales tout au moins, ne présente pas de propriétés hémolytiques comme en fait foi le tube témoin.

TABLEAU 26.

B. — Mélange venin sérum.

Test hématies de cheval.

FORMATION DE LYSOCITHINE à 25° C pendant :	TUBES.	A	B	C	D	E	F	T
1/4 heure.		5	5	5	1,5	0	0	0
1/2 heure		5	5	5	2	0	0	0
1 heure		5	5	5	4	0,5	0	0
3 heures		3,5	5	5,5	5	4	0	0
5 heures		2,5	4	5	5	5	0,5	0
7 heures		2	3,5	4	4,5	4,5	2	0

De la lecture de ce tableau il se dégage un fait nouveau qu'on ne trouvait pas avec les suspensions de lécithine. Ce fait nouveau c'est l'existence d'un optimum. Il y a un temps de contact optimum au delà duquel le pouvoir hémolytique du mélange, c'est-à-dire la richesse en lysocithine, décroît. Il est intéressant de noter que le pouvoir hémolytique de la lysocithine formée décroît d'autant plus vite que la concentration en venin est plus élevée.

Il semble que la lysocithine formée les premières minutes perd son pouvoir hémolytique en présence de fortes doses de venin. Les faits sont à rapprocher de l'action empêchante des fortes doses de venin étudiée au chapitre III et des faits rapportés par Mlle Ledebt : le mélange venin-sérum passe par un maximum, puis s'atténue et disparaît. L'inactivation serait due à l'action diastasique du venin.

CONCLUSIONS.

En présence d'une suspension de lécithine la formation de lysocithine croît avec l'augmentation du temps de contact pour aboutir à une valeur maximale pratiquement constante dans les conditions d'expérience; au contraire, en présence de sérum, il existe un temps de contact optimum qui est fonction de la richesse en venin.

2° VARIATION DU POUVOIR HÉMOLYTIQUE DE LA LYSOCITHINE EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT AVEC LES HÉMATIES.

La lysocithine formée provenait soit du mélange venin-lécithine maintenu une heure à 37° C soit du mélange venin-sérum placé dans les mêmes conditions. On éprouve le pouvoir hémolytique en laissant en contact ces mélanges et des suspensions d'hématies de cheval des temps variant de 15 minutes à 7 heures. Dans le cas du mélange venin-sérum nous n'avons pu dépasser 5 heures, car après ce temps il y a des changements de coloration qui rendent les mesures colorimétriques impossibles.

TABLEAU 27.

A. — Mélange venin-lécithine.

(*Test hématies de cheval. Formation de lysocithine : 1 heure à 37° C.*)

TEMPS DE CONTACT AVEC LES HÉMATIES.	TUBES.	A	B	C	D	E	T
0 heure.		4	2	0	0		0
1/2 heure.		5	3,5	1	0		0
1 heure.		6	5	2	0		0
3 heures.		6	5	4	0		0
5 heures.		6	6	5	1,5	0	0
7 heures.		7	6	4	1	0	0

TABLEAU 28.

B. — Mélange venin-sérum.

Test hématies de cheval. Formation de lysocithine : 1 heure à 37° C.

TEMPS DE CONTACT AVEC LES HÉMATIES.	TUBES.	A	B	C	D	E	F	G	T
0 heure.		0	0	0	0				0
1/2 heure.		3	3,5	4	4	3,5	0		0
1 heure.		3,5	4,5	5	5	4,5	0		0
3 heures.		5	7	7	7	7	1,5	0	0
5 heures.		5	7	7	7	7	3,5	1	0
7 heures (changement de coloration). . . .		(4)	(5)	(5)	(6)	(5)	(3)	(2)	0

On constate à la lecture de ces tableaux que l'hémolyse recherchée sur le mélange venin-lécithine ou venin-sérum est d'autant plus forte que le temps de contact est plus considérable. Toutefois, il y a une différence entre les deux cas; en effet dans le cas du mélange venin-lécithine la valeur la plus importante de l'hémolyse correspond à la concentration la plus élevée en venin tandis que dans le cas du mélange venin-sérum le maximum correspond aux concentrations de venin du 1/10.000e et 1/50.000e ainsi que nous l'avons indiqué chapitre III.

Mais pour chaque concentration de venin la lysothine formée se trouvant en présence d'hématies exerce aussitôt son pouvoir lytique, ce qui explique une augmentation de l'hémolyse en fonction du temps (tableaux 27 et 28) contrairement aux expériences précédentes (tableau 26) où la lysocithine formée perd son pouvoir avant d'être en contact avec les hématies.

En effet, dans une première phase le venin libère l'hémolysine du sérum. Dans une deuxième phase il dédouble la lysocithine formée, ce qui entraîne la perte de son pouvoir hémolytique. Mais ce dernier fait ne saurait être observé aux tableaux 27 et 28, car l'hémoglobine libérée ne saurait repasser dans les globules.

CONCLUSIONS.

Tous les autres facteurs étant constants par ailleurs, l'hémolyse est d'autant plus considérable que le temps de contact entre lysocithine et hématies est plus long.

CHAPITRE VII.

Sérum antivenimeux

En 1887 Sewall, expérimentant sur le venin de crotale, avait montré qu'on peut rendre les pigeons graduellement plus résistants à l'action de ce venin en leur injectant des doses d'abord très petites, incapables de provoquer des accidents graves, puis des doses de plus en plus fortes. Il était ainsi parvenu à faire supporter à ces animaux, pourtant très sensibles, des doses dix fois supérieures à la dose minima mortelle.

Kaufmann en 1889 obtenait le même résultat avec le venin de vipère de France; mais il ne réussissait pas à produire l'accoutumance au delà de doses deux ou trois fois mortelles.

La possibilité d'immuniser les petits animaux de laboratoire contre le venin des serpents établie par ces deux auteurs est restée sans application pratique jusqu'aux mémorables travaux de Phisalix et Bertrand sur le venin de vipère et de Calmette sur le venin de cobra.

Leurs expériences ont permis d'établir les faits suivants de la sérothérapie anti-ophidique :

1° Qu'il était possible en vaccinant de petits animaux (cobayes ou lapins) de leur conférer une immunité vraiment solide contre le venin.

2° Que les animaux vaccinés contre le venin de cobra supportaient impunément des doses de venin de vipère ou d'autres reptiles (bungarus, cerastes, naja, haze, pseudechis) certainement mortelles pour les témoins.

3° Que le sérum des animaux vaccinés renfermait des substances antitoxiques capables de transmettre l'immunité aux animaux non préparés, aux animaux « neufs ».

Phisalix et Bertrand ont établi que la meilleure méthode d'immunisation contre le venin de vipère pour le cobaye consistait à injecter une dose de 0,4 mg. de ce venin chauffé à 75 degrés pendant cinq minutes, et à recommencer quarante-huit heures après avec la même dose de venin non chauffé.

Calmette préconise la méthode suivante pour le venin de cobra. Il injecte d'abord de petites doses de ce venin mélangé à une quantité égale d'une solution à 1 p. 100 d'hypochlorite de chaux. Il répète les injections

tous les trois ou quatre jours en augmentant peu à peu la quantité de venin et en diminuant progressivement celle d'hypochlorite. S'il survient de l'amaigrissement il suspend les injections pour les reprendre dès que le poids redevient normal. Après quatre injections de venin avec l'hypochlorite il inocule directement une demi-dose minima mortelle de venin pur; trois ou quatre jours après, les trois quarts de cette même dose minima mortelle, et enfin, trois ou quatre jours après, une dose mortelle.

Par cette méthode Calmette est arrivé à faire suporter à un lapin en six mois, 100 doses mortelles. Le sérum des lapins ainsi traités ne tarde pas à montrer des propriétés antitoxiques *in vitro*.

Par ce moyen, Calmette parvient à immuniser des chevaux afin d'obtenir des sérums très antitoxiques contre le venin des serpents. Un délai de seize mois est nécessaire pour obtenir un sérum suffisamment antitoxique (0,025 g. de venin de cobra suffisent pour tuer un cheval en 12 à 24 heures) ; lorsqu'un cheval supporte sans réaction 2 grammes de venin sec de cobra (dose environ 80 fois mortelle) injectés en une seule fois sous la peau on peut le saigner à plusieurs reprises.

Chaque prise de sang est testée rigoureusement par des mesures du pouvoir antitoxique et du pouvoir préventif.

Un sérum antivenimeux peut être considéré comme utilisable lorsqu'un mélange de 1 centimètre cube de sérum avec 0,001 g. de venin de cobra ne produit aucun accident d'intoxication chez le lapin et lorsque 2 centimètres cubes de sérum injectés préventivement à un lapin de 2 kilogrammes environ par voie sous-cutanée lui permettent de résister deux heures après à l'inoculation, également par voie sous-cutanée, de 1 milligramme de venin. Il ne faut pas oublier que le chiffre obtenu n'est valable que pour l'espèce animale à laquelle les mélanges ont été inoculés.

Pour la mesure du pouvoir préventif on injecte au lapin 2 centimètres cubes de sérum dans la veine marginale de l'oreille droite et, cinq minutes après, 1 milligramme de venin dans la veine marginale de l'oreille gauche.

A la dose de 1 milligramme les témoins meurent en 2 à 3 heures par injection sous-cutanée et en moins de 30 minutes par injection intraveineuse.

En 1914 Vital-Brazil prépara un sérum anticrotalique et un sérum antibothropique en suivant une technique différente de celle qu'avait établie Calmette. Il injectait le venin pur sans avoir recours au mélange avec l'hypochlorite de chaux. Dans le but d'activer l'immunisation de l'animal il fait au cheval ou au mulet une injection endoveineuse de sérum antitoxique. Quelques heures après il commence l'immunisation par une dose de venin égale à cent ou deux cents fois la dose ordinaire. Dans la seconde injection il réduit la dose à la moitié de celle du début, dans la troisième à un quart, dans la quatrième à un huitième, et ainsi de suite jusqu'à ce que l'on arrive dans cette échelle descendante à la dose d'environ 1 milligramme. Après cette première phase il reprend avec précaution l'échelle ascendante, en augmentant peu à peu les doses

à injecter et en interrompant le processus aussitôt que l'on constate une diminution dans le poids de l'animal. Il est ainsi parvenu à réduire de moitié le temps nécessaire pour obtenir le sérum et ce nouveau processus d'immunisation dure environ six mois.

Le sérum antivenimeux ainsi obtenu est dosé de la façon suivante :

Dans une série de petits tubes à essais on introduit 1 centimètre cube de sérum à doser et des quantités de venin progressivement croissantes pour chaque tube; puis on ajoute à chaque tube la quantité de sérum artificiel nécessaire pour parfaire le volume à 2 centimètres cubes. Les tubes sont ensuite placés pendant une heure dans l'étuve à 37°. Dans les mélanges voisins de la neutralisation on observe un trouble. Ce trouble sert à peine comme un indice du point de neutralisation, et pour constater si un mélange est neutre il est nécessaire de l'injecter dans les veines d'un pigeon. Si le pigeon résiste en présentant de légers symptômes d'empoisonnement on peut considérer comme neutre la dose immédiatement inférieure.

Aussitôt qu'on a fait la mesure de la valeur antitoxique d'un sérum antivenimeux on le répartit dans de petits flacons stérilisés de 10 centimètres cubes, sans addition d'aucun antiseptique. On chauffe ensuite les flacons hermétiquement bouchés dans un bain-marie à la température de 58° pendant une heure et on répète cette opération trois jours de suite. Le sérum ainsi préparé garde intacte sa valeur antitoxique pendant environ deux ans sous tous les climats. Parfois, on aperçoit des flocons, mais ils ne sont pas un indice d'altération. Ils sont constitués par des dépôts d'albumine précipitée qu'une agitation violente peut redissoudre en partie.

Le sérum antivenimeux peut également être conservé presque indéfiniment à l'état sec, dans des tubes de verre scellés à la lampe. En cet état on le fractionne ordinairement par doses de 1 gramme, et lorsqu'on veut s'en servir, il suffit de dissoudre une dose dans 10 centimètres cubes d'eau bouillie et refroidie. On injecte ensuite cette solution sous la peau comme s'il s'agissait du sérum liquide.

Actuellement on immunise les chevaux en trois mois par les anavenins. Les anavenins sont des solutions atténuées de venin. Par action du formol à 1 p. 100 à 40° C sur une solution de venin au 1/1.000^{e} on obtient l'anavenin en trois semaines environ. M. Arthus a montré qu'on obtient par action du chlorure de chaux à 2 p. 100 sur les solutions venimeuses au 1/1.000^{e} la transformation à peu près instantanée des venins en paravenins, paravenins rigoureusement équivalents à tous égards aux anavenins.

Indépendamment des mesures déjà indiquées le pouvoir antitoxique du sérum antivenimeux peut être déduit de la mesure de son pouvoir antihémolytique.

Dès 1895 Calmette puis Stephens et Myers avaient montré que la mesure de la neutralisation du venin par le sérum antivenimeux était la même *in vivo* que *in vitro* et que cette neutralisation était spécifique. Ces derniers auteurs cependant notèrent que cette action n'était pas

constante, le sérum antivenimeux pouvant soit empêcher soit activer l'hémolyse à doses incomplètement neutralisantes. Mais, en restant dans les limites de la dose minima mortelle de venin, Calmette a montré que le phénomène de neutralisation acquiert assez de constance et que l'activité antitoxique *in vivo* d'un sérum antivenimeux peut être mesurée par son pouvoir antihémolytique *in vitro* par la méthode suivante :

Dans une série de tubes à essai on répartit 1 centimètre cube d'une dilution à 5 p. 100 de sang de cheval défibriné qu'on additionne ensuite d'une dose constante de venin. A chacun des tubes on ajoute des quantités progressivement croissantes de sérum à titrer en commençant par 0,01 cm³, 0,02 cm³, 0,03 cm³, etc., jusqu'à 0,1 cm³. Un tube-témoin ne reçoit pas de sérum.

On introduit dans tous les tubes 0,0001 g. de venin et 0,2 cm³ de sérum normal de cheval, privé d'alexine par un chauffage préalable d'une demi-heure à 58 degrés.

A la température de 16 degrés environ l'hémolyse commence dans le tube-témoin en 15 à 20 minutes. Dans les autres tubes elle se produit avec un retard d'autant plus grand que la dose de sérum ajouté est plus considérable.

L'expérience montre qu'on peut considérer comme bons pour l'usage thérapeutique les sérums qui, à la dose de 0,05 cm³, empêchent complètement l'hémolyse par 0,0001 g. de venin de cobra, de bungarus, etc., et ceux qui, à la dose de 0,7 cm³, empêchent l'hémolyse par 0,001 g. de venin de *lachesis* ou de *vipera berus*.

Etudiant cette action antihémolytique, M^lle^ Ledebt arrive à la conclusion que l'action neutralisante des sérums antivenimeux (sous réserve de leur spécificité) ne se manifeste que sur la formation de la lysocithine, qu'il s'agisse des mélanges venin-vitellus ou venin-sérum.

D'autres auteurs prétendent, au contraire, que le sérum antivenimeux neutralise simplement l'action de l'hémolysine du couple venin-sérum et qu'il est sans action sur l'hémolyse produite par les couples venin-lécithine, venin-lipoïdes.

Devant ce désaccord nous avons étudié systématiquement l'action du sérum antivenimeux d'une part sur la formation de la lysocithine et d'autre part sur le pouvoir hémolytique de la lysocithine : cette lysocithine résultant soit du couple venin-sérum soit du couple venin-lécithine.

1° INFLUENCE DU SÉRUM ANTIVENIMEUX SUR LA FORMATION DE LA LYSOCITHINE.

A. — Cas des suspensions de lécithine.

Nous avons fait trois séries de tubes renfermant des doses de venin progressivement décroissantes suivant la gamme établie dans notre technique. A chacun des tubes nous avons ajouté un demi-centimètre cube de suspension de lécithine au 1/10.000^e^. Dans la première série des tubes

qui constitue la série témoin nous avons ajouté 2 gouttes de sérum physiologique, dans la deuxième série 2 gouttes de sérum de cheval et dans la troisième 2 gouttes de sérum antivenimeux. Tous les tubes sont ainsi portés à l'étuve à 37° C. pendant une heure pour permettre la formation de la lysocithine. A la sortie de l'étuve on ajoute dans chacun des tubes 1 centimètre cube d'une suspension au 1/20e d'hématies de cobaye. On laisse pendant une demi-heure à la température du laboratoire et après centrifugation on note l'hémolyse. Le tableau 29 ci-dessous résume l'ensemble de nos résultats.

TABLEAU 29.

A. — Mélange venin-lécithine.

Test hématies de cobaye (hémolyse : demi-heure à la température de laboratoire).

FORMATION DE LYSOCITHINE 1 heure à 37° DANS LES CONDITIONS CI-DESSOUS.	TUBES	A	B	C	D	E	F	T
Témoin.. 1/2 cm³ suspension lécithine. . . . . 1/2 cm³ solutions de venin. . . . . 2 gouttes sérum physiologique.		3,5	2	1	0	0	0	0
Exp. 1.. 1/2 cm³ suspension lécithine. . . . . 1/2 cm³ solutions de venin. . . . . 2 gouttes sérum de cheval.		3	2,5	2,5	2	1,5	1	0
Exp. 2.. 1/2 cm³ suspension lécithine. . . . . 1/2 cm³ solutions de venin. . . . . 2 gouttes de sérum antivenimeux. . . .		1,5	1	0	0	0	0	0

De la lecture de ce tableau il ressort que l'action protectrice du sérum antivenimeux est très nette par rapport aux deux témoins : témoins faits avec la solution de sérum physiologique et de sérum de cheval. Ce dernier fait suffit à lui seul pour montrer que l'action antihémolytique du sérum antivenimeux ainsi mise en évidence ne saurait être confondue avec le pouvoir antihémolytique banal que l'on serait tenté d'attribuer au sérum ordinaire à cause du cholestérol qu'il renferme.

B. — Cas du sérum.

Nous avons fait une expérience identique à la précédente mais en substituant le sérum à la lécithine. Dans ce cas nous avons simplement deux séries de tubes : une série de tubes contenant 0,5 cm³ de sérum de cheval additionné de 2 gouttes de sérum antivenimeux et la série témoin où chaque tube contient du sérum frais à raison de 0,5 cm³ plus 2 gouttes par tube pour avoir égalité de volume avec la série précédente.

TABLEAU 30.

B. — Mélange venin-sérum.

Test hématies de cobaye (hémolyse : demi-heure à la température du laboratoire).

FORMATION DE LYSOCITHINE (1 heure à 37° dans les conditions ci-dessous.	TUBES	A	B	C	D	E	F	G	T
Témoin.. 1/2 cm³ sérum de cheval. . 1/2 cm³ solutions de venin 2 gouttes sérum de cheval		4	3,5	5	4.5	4	2	0	0
Exp. 1.. 1/2 cm³ sérum de cheval. . 1/2 cm³ solutions de venin 2 gouttes sérum antivenimeux.		2,5	3	1,5	0	0	0		0

Dans ce cas comme dans le cas précédent, qu'il s'agisse du mélange venin-lécithine ou venin-sérum, la présence de sérum antivenimeux inhibe dans une certaine mesure la formation de lysocithine.

2° ACTION DU SÉRUM ANTIVENIMEUX SUR LE POUVOIR HÉMOLYTIQUE DE LA LYSOCITHINE.

Nous envisageons maintenant le cas où la lysocithine résultant soit du mélange venin-lécithine soit du mélange venin-sérum s'est formée dans les conditions habituelles, c'est-à-dire : un demi-centimètre cube de solution de venin à différents titres plus un demi-centimètre cube de suspension de lécithine ou, suivant le cas, un demi-centimètre cube de sérum de cheval sont maintenus pendant une heure à l'étuve à la température de 37° C.

C'est simplement à la sortie de l'étuve, c'est-à-dire après la formation de la lysocithine, que nous ajoutons le sérum antivenimeux. Dans chaque tube nous ajoutons 2 gouttes de sérum antivenimeux et 1 centimètre cube d'une suspension au 1/20e d'hématies de cobaye. Après un séjour d'une demi-heure à la température du laboratoire nous centrifugeons et notons l'hémolyse.

Dans le cas de la lécithine (tableau 31) nous avons, pour les raisons précédemment indiquées, trois séries de tubes. Dans le cas de sérum (tableau 32) nous avons simplement la série témoin où nous avons ajouté 2 gouttes de sérum frais de cheval pour avoir égalité de volume avec la série additionnée de 2 gouttes de sérum antivenimeux.

TABLEAU 31.

A. — Mélange venin-lécithine.

Test hématies de cobaye. (*Formation de lysocithine : 1 heure à 37°.*)

ACTION DE LA LYSOCITHINE DANS LES CONDITIONS CI-DESSOUS.	TUBES	A	B	C	D	E	F	T
Témoin.. Lysocithine formée : + 1 cm³ suspension d'hématies. . . . . + 2 gouttes sérum physiologique. . . .		3,5	2	1	0	0		0
Exp. 1.. Lysocithine formée : + 1 cm³ suspension d'hématies. . . . . + 2 gouttes sérum de cheval.		4	4	2,5	1,5	1	Traces	0
Exp. 2.. Lysocithine formée : + 1 cm³ suspension d'hématies. . . . . + 2 gouttes sérum antivenimeux. . . .		2	0,5	0	0	0		0

TABLEAU 32.

B. — Mélange venin-sérum.

Test hématies de cobaye. (*Formation de lysocithine : 1 heure à 37°.*)

ACTION DE LA LYSOCITHINE dans les conditions ci-dessous.	TUBES	A	B	C	D	E	F	G	T
Témoin.. Lysocithine formée : + 1 cm³ suspension d'hématie. . . . . + 2 gouttes sérum de cheval.		4	3,5	5	4,5	4	2	0	0
Exp. 2.. Lysocithine formée : + 1 cm³ suspension d'hématie. . . . . + 2 gouttes sérum antivenimeux. . . .		2	3	3	3	3,5	1,5	0	0

Par conséquent, le sérum antivenimeux n'a pas seulement la propriété d'inhiber la formation de lysocithine, mais il est encore capable d'empêcher l'action hymolytique de la lysocithine formée, et ceci indépendamment de la quantité de cholestérol qu'il renferme (cholestérol-sérum cheval 0,85 cholestérol du sérum A. V. 0,54).

CONCLUSIONS.

En définitive, nous avons considéré quatre cas, suivant que l'addition de sérum antivenimeux était faite avant ou après formation de lysocithine et suivant que cette lysocithine provenait du contact entre le venin et le sérum ou le venin et une suspension de lécithine.

Dans les quatre cas nous avons assisté à une action antihémolytique du sérum antivenimeux par rapport aux tubes-témoins ren-

fermant des doses égales de sérum physiologique ou de sérum de cheval, ce qui permet, nous semble-t-il, d'éliminer l'action tout au moins élective du cholestérol.

De plus, il nous a semblé que dans le cas du sérum le sérum antivenimeux agissait plus par inhibition de la transformation de lécithine en lysocithine que par neutralisation de la lysocithine formée. Inversement, dans le cas d'une suspension de lécithine, il nous semble que l'action antihémolytique du sérum antivenimeux serait plus manifeste par neutralisation de la lysocithine que par inhibition de la transformation de la lécithine en lysocithine.

CHAPITRE VIII.

Action inhibitrice du cholestérol

En 1897 Phisalix a soutenu que la cholestérine injectée aux animaux se comporte vis à-vis du venin de vipère comme un véritable « vaccin chimique ». Il a affirmé, en outre, « que son pouvoir antitoxique est manifeste et assez puissant pour s'exercer encore 5 à 10 minutes après l'inoculation du venin ». Par contre, Calmette n'a pu observer le moindre retard dans l'intoxication chez les animaux injectés de cholestérine et Delezenne et Mlle Lederf n'ont eu que des résultats négatifs.

Kyes, en 1902, montra que la cholestérine est un puissant antagoniste du cobra-lecithide. Il établit l'indépendance de l'hémolysine et de la neurotoxine, car, dans le complexe venin-lécithide, la cholestérine détermine un precipité et le liquide surnageant a perdu tout pouvoir hémolytique, mais il reste neurotoxique.

En 1905 Abderhalden et Le Count essayent de préciser le mécanisme de la propriete inhibitrice de la cholestérine en employant des cholesterines de diverses provenances et ses dérivés. Ces auteurs arrivent à la conclusion que le groupe hydroxyle libre est indispensable à l'action antihémolytique de ces corps.

La même annee Flexner et Noguchi précisent que l'action empêchante s'exerce contre la lécithine et non contre le venin.

En 1907 Ishizaka montre la même action inhibitrice dans l'étude de l'hémolyse par le venin de *lachesis flaroviridis*.

Enfin Delezenne et Mlle Lederf, en 1912, s'attachent à l'étude de l'action antitoxique et antihemolytique de la cholestérine. Ils constatent que l'action neutralisante de la cholestérine sur la lysocithine se fait molecule à molécule. Dans le cas particulier de l'hémolyse, lysocithine et cholestérine forment une véritable combinaison moléculaire dénuée de toute propriété hémolytique. Par contre, le cholestérol paraît incapable d'empêcher les phenomènes d'envenimation chez les mammifères, car il ne possède pas à proprement parler une action neutralisante directe à l'égard des venins, exception faite pour le venin de *daboïa*.

Au cours de nos expériences nous utilisons une suspension de lecithine au 1/10.000e et la gamme habituelle des solutions de venin.

Après avoir vérifié qu'une goutte d'alcool éthylique ajoutée à 1 centimètre cube de mélange venin-lécithine n'était pas hémolytique, nous uti-

lisons trois solutions S_1 S_2 S_3 de cholestérol dans l'alcool éthylique. Le titre de la solution S_2 était calculé de façon à ce qu'une goutte apportât un poids de cholestérol égal à celui de la lécithine contenu dans le mélange. La solution S_1 était dix fois plus concentrée et S_3 dix fois moins concentrée. Par ce procédé nous introduisons en même temps que le cholestérol un corps étranger, l'alcool, mais nous faisons pour chaque expérience un tube-témoin contenant la même quantité d'alcool. Ce procédé a, en outre, l'avantage de ne pas modifier sensiblement le volume des réactifs et surtout de nous permettre d'opérer chaque fois avec le même volume. La technique de Mme Ledebt, qui consiste à faire arriver la solution acétonique de cholestérol dans l'eau bouillante de façon à obtenir des suspensions de cholestérol exemptes de corps étrangers (acétone), ne permet pas d'avoir des suspensions de même titre d'une expérience à l'autre.

Dans une première série d'expériences, nous mettons en contact 1 demi-centimètre cube de suspension de lécithine, plus 1 demi-centimètre cube de solution de venin, plus une goutte de solution alcoolique de cholestérol. Ce mélange est maintenu une heure à 37° C. On ajoute 1 centimètre cube de la suspension d'hématies de cobaye et on laisse en contact 1 demi-heure à 37° C. Après centrifugation, on note l'hémolyse. La solution témoin est constituée par 1 demi-centimètre cube de lécithine, plus 1 demi-centimètre cube de venin, plus 1 goutte d'alcool.

TABLEAU 33.

ADDITION DE CHOLESTÉROL AVANT FORMATION DE LYSOCITHINE.

TUBES.	A	B	C	D	E	F	T
Témoin.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte alcool..	6	5	4,5	3	1,5	1	0
Exp. 1.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte S_1.....	4,5	1,5	0,5	0	0	0	0
Exp. 2.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte S_2.....	4	3,5	1,5	0	0	0	0
Exp. 3.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte S_3.....	5	4	4	1,5	0,5	0	0

Nous reprenons les mêmes expériences en ajoutant la goutte de solution alcoolique de cholestérol avant les hématies, c'est-à-dire après la formation de lysocithine.

TABLEAU 34.

ADDITION DE CHOLESTÉROL APRÈS FORMATION DE LYSOCITHINE.

TUBES.	A	B	C	D	E	F	T
Témoin.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte alcool.. + 1 cm³ suspension d'hématies. . .	6	5	4,5	3	1,5	1	0
Exp. 1.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte S_1..... + 1 cm³ suspension d'hématies. . .	4,5	1,5	1	0	0	0	0
Exp. 2.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte S_2..... + 1 cm³ suspension d'hématies. . .	4,5	4	1	0	0	0	0
Exp. 3.. 1/2 cm³ lécithine + 1/2 cm³ venin.. + 1 goutte S_3..... + 1 cm³ suspension d'hématies. . .	6	5	4	1	0,5		

D'après ces deux tableaux, la présence de cholestérol entrave nettement l'hémolyse. Les effets se font sentir même pour la solution la plus diluée S_3, mais, à partir de la solution S_2, qui contient un poids de cholestérol égal à celui de la lécithine, les effets sont sensiblement les mêmes que pour la solution S_1, dix fois plus concentrée. D'autre part, les effets inhibiteurs semblent les mêmes, que l'addition de cholestérol se fasse avant ou après la formation de la lysocithine.

CONCLUSIONS.

Lorsque le cholestérol est ajouté en quantité suffisante il s'oppose de façon notable à l'hémolyse, que l'addition soit faite avant ou après formation de la lysocithine. Cette action univoque se comprend fort bien si l'on admet avec DELEZENNE, FOURNEAU et M^lle^ LEDEBT que le cholestérol est capable de se combiner molécule à molécule avec la lysocithine et de former un complexe dépourvu de toute propriété hémolytique.

CHAPITRE IX.

Nature des sérums

Très généralement, le sang d'une espèce détruit les globules d'une autre espèce. Toutefois, le sang du « cobaye » ne détruit pas ou n'atteint que très légèrement les hématies du « lapin ». Mais il suffit que le cobaye reçoive quelques injections de sang défibriné de lapin pour que son sérum (ou son sang) agglutine et détruise désormais les hématies de ce dernier. Que s'est-il passé? L'expérience va nous le montrer. Soient A le sérum « neuf » et inactif du cobaye, A′ le sérum actif (contre les hématies du lapin) obtenu par les injections précédentes. En chauffant A′ à 56° nous obtiendrons un nouveau sérum A″ inactif comme A. Mais si nous mélangeons A et A″, (A + A″) donnera un quatrième sérum A‴ de même activité que A′, de sorte que l'on peut, au point de vue qualificatif, écrire A + A″ = A′. De cette égalité résulte que l'activité de A′ est la somme des activités partielles de deux substances : l'une, que A n'avait pas, acquise par A′ que le chauffage à 56° n'a pas détruite, existe donc encore dans A″; l'autre, ancienne, qui existait dans A, mais que la chaleur a détruite, ne se retrouve donc plus dans A″.

D'ailleurs, seule la nouvelle substance est un anticorps spécifique, tandis que l'autre est commune, car il suffit d'ajouter à A″ le sérum neuf d'une espèce quelconque pour obtenir le mélange A‴ actif contre les hématies du lapin.

La substance commune grâce à laquelle tous les sangs jouissent d'un « potentiel » destructeur a reçu le nom d'*alexine* tandis qu'à l'anticorps spécifique acquis Bordet a réservé le nom de *sensibilisatrice* pour bien marquer que c'est la substance qui rend le globule ou l'élément étranger vulnérable à l'action destructrice de l'alexine, comme le mordant des teinturiers rend un tissu sensible au colorant.

Au lieu de *sensibilisatrice,* on peut avec Ehrlich adopter le mot *clé* ou *amboceptcur,* image qui fait comprendre que la même main (alexine) peut ouvrir une serrure quelconque (éléments étrangers) pourvu qu'on lui en donne la clé.

Tout sang, tout sérum normal, outre son alexine, possède un ou plusieurs pouvoirs sensibilisateurs. Par exemple, le sérum normal du cobaye est à peine hémolytique pour les globules de la chèvre; celui du lapin l'est davantage : preuve qu'il contient une sensibilisatrice plus puissante à l'égard de ces globules. Le jeu de ces sérums réclame donc alexine et sensibilisatrice :

1° L'alexine est nécessaire; en effet le sérum de lapin privé de son alexine par chauffage à 56° C devient inactif pour les globules de chèvre.

mais récupère toute son activité si on lui ajoute du sérum frais de cobaye, c'est-à-dire de l'alexine seule (puisque ce sérum n'a pas de sensibilisatrice) ;

2° La sensibilisatrice est nécessaire; en effet, le sérum de lapin chauffé à 56° C et laissé au contact des globules de chèvre ne récupère plus son activité si on lui ajoute l'alexine d'un sérum frais de cobaye, parce que les globules de chèvre, pendant ce contact, ont absorbé toute la sensibilisatrice.

La lécithine serait donc la substance du sérum qui active le venin jouant le rôle de *complément* dans la théorie d'Ehrlich ou *d'alexine* dans la théorie de Bordet.

Le venin correspond à l'*ambocepteur* (Ehrlich) ou à la *sensibilisatrice* (Bordet).

La lécithine serait une alexine plus résistante à la chaleur que celle qui agit dans l'hémolyse par les sérums. Mais l'action du chauffage sur le sérum est peut-être plus complexe qu'on ne l'avait admise tout d'abord. Ce chauffage non seulement détruirait l'alexine mais ferait apparaître une antihémolysine dont la nature reste encore bien obscure. Toutefois, d'après les recherches modernes (Milkovitch), cette action antihémolytique, sans être niée par les auteurs, serait attribuable d'après certains moins à l'existence d'une antihémolysine en tant que substance déterminée qu'au manque des conditions chimiques favorables à l'hémolyse produit par le chauffage.

Nous utilisons donc au cours de nos expériences du sérum de différentes espèces animales, préalablement chauffé une heure à 56° C afin qu'il ne soit pas déjà hémolytique pour les globules en expérience.

Dans une première série d'expériences nous éprouvons le pouvoir hémolytique de divers sérums (mouton, veau, bœuf, cobaye, cheval) vis-à-vis d'un test fixe : hématies de cobaye; seul le sérum de cheval nous donne des hémolyses notables.

TABLEAU 35.

TEST HÉMATIES DE COBAYE.

TUBES.	A	B	C	D	E	F	T
Sérum de mouton.	0	0	0	0	0	0	0
Sérum de veau.....	0	0	0	0	0	0	0
Sérum de bœuf.....	0	0	0	0	0	0	0
Sérum de cobaye.....	0	0	0	0	0	0	0
Sérum de cheval.....	4	3,5	3	4,5	4	2	0

Nous avons obtenu des résultats analogues avec les hématies de bœuf, de veau et de mouton.

Devant cet insuccès nous avons examiné le comportement des hématies de cheval vis-à-vis de divers sérums : cheval, bœuf, veau, mouton.

TABLEAU 36.

TEST HÉMATIES DE CHEVAL.

TUBES.	A	B	C	D	E	F	T
Sérum de mouton.	2	4	4	3	1	0	0
Sérum de veau.....	1	2,5	3	2,5	1	0	0
Sérum de bœuf.....	3	4	4,5	4,5	4	2	0
Sérum de cheval.....	5,5	6	6,5	5 5	3	2	0

CONCLUSIONS.

La notion qui se dégage c'est l'impression de grandes variations individuelles. Il est impossible de faire une classification de sérums. Le seul test utilisable serait les hématies de cheval, test donnant d'ailleurs des résultats divergents d'un individu à l'autre. Mais de toutes ces expériences, on peut conclure que le sérum de cheval favorise nettement l'hémolyse.

CHAPITRE X.

Action cytolytique sur les têtards

Jusqu'ici nous avons étudié l'action cytolytique des venins sur des hématies particulières que sont les hématies du sang des mammifères. Dans ce chapitre nous cherchons à étendre nos conclusions en examinant ce pouvoir cytolytique vis-à-vis des têtards.

Les larves des batraciens peuvent en effet être considérées dans bien des cas comme des réactifs de choix pour les pharmacologistes. La possibilité de s'en procurer de façon abondante et de les grouper par lot de même origine, leur manipulation commode, leur croissance rapide et d'observation aisée, la facilité avec laquelle elles sont susceptibles d'absorber les substances à essayer soit « per os » soit par les branchies ou les téguments les ont signalées depuis longtemps à l'attention des expérimentateurs et Dastugue et Souquières sont revenus récemment sur cette question.

Fontana en 1787 avait étudié l'action du venin de vipère sur quelques animaux à sang-froid. Il avait conclu de ses recherches que la grenouille et certaines espèces de poissons succombent à la morsure de ce serpent quoique la mort soit, en général, beaucoup plus tardive que chez les mammifères ou les oiseaux.

En 1861 Weir-Mitchell étudiant les effets du venin de crotale sur la grenouille avait observé deux formes d'intoxication chez cet animal : un empoisonnement aigu et un empoisonnement chronique.

Brunton et Frayer, en 1874, provoquèrent la mort de la carpe en lui injectant du venin de cobra.

Noguchi, en 1904, put déterminer la toxicité des venins de cobra, de mocassin et de crotale sur un grand nombre d'animaux à sang-froid.

Dans toutes les expériences qui précèdent les venins étaient introduits directement dans les tissus ou la cavité péritonéale. Plus récemment, M^lle^ Ledebt étudia l'action de différents venins en les ajoutant simplement au milieu extérieur dans lequel étaient maintenus les animaux : eau distillée, eau de source ou solutions salines diverses. Les animaux étaient mis en présence de quantités fixes et uniformes de liquide : 150 centimètres cubes pour les poissons, 40 centimètres cubes pour les têtards. Les venins dissous au préalable en solution concentrée dans l'eau redistillée étaient ajoutés à doses variables au milieu avant d'y introduire les animaux.

Mlle Ledebt remarqua que les têtards de *rana temporaria* immergés dans les solutions de venin de cobra se comportent à peu près de la même façon que les poissons. La paralysie évolue en général plus lentement; mais c'est surtout chez les têtards que l'on peut observer la persistance prolongée des battements du cœur alors que la respiration a totalement cessé, et qu'il est devenu impossible de provoquer artificiellement la moindre réaction motrice ou sensitive. Avec le venin de cobra la mort survenait d'ordinaire en moins d'une heure avec des solutions de venin de titre supérieur au 1/50.000e. Elle se produisait en quatre à six heures avec des solutions au 1/200.000e; enfin elle n'apparaissait qu'après douze à quinze heures, quelquefois même après vingt-quatre heures quand on descendait aux doses limites, c'est-à-dire à des solutions de titres compris entre 1/400.000e et 1/500.000e.

Il nous a été impossible de nous procurer des poissons et nos expériences ont simplement porté sur des têtards. Nous avons examiné comparativement la durée de survie dans les solutions de venin et dans les mélanges venin-lécithine. Ces différentes solutions étaient elles-mêmes préparées soit avec de l'eau distillée soit avec une solution de chlorure de sodium à 4,5 p. 100. Les têtards effectivement supportent le chlorure de sodium pendant plus d'une semaine à la concentration N/10. Une concentration correspondant au titre de 8 p. 1.000 ne permet guère aux têtards de survie dépassant vingt à vingt-quatre heures, alors qu'ils peuvent vivre plusieurs jours dans une solution à 7 p. 1.000. Si l'on veut constituer des milieux artificiels avec le chlorure de sodium il est utile de ne pas dépasser la concentration N/10 car, dans les solutions plus concentrées les animaux présentent des troubles plus ou moins graves paraissant en relation avec des modifications de la tension osmotique.

De la moyenne de nos expériences il résulte que dans l'eau distillée la durée de survie était de sept heures et demie pour une concentration en venin de 1/20.000e et de cinq heures et quart pour une concentration de 1/4.000e alors que dans les solutions à 4,5 p. 1.000 de NaCl la mort survenait au bout de sept heures trente pour une concentration en venin de 1/20.000e et de quatre heures et quart pour une concentration de 1/4.000e. Pratiquement, il n'y a pas de différence sensible entre la durée de survie dans l'eau distillée et dans une solution de NaCl à 4,5 p. 1.000 à la température du laboratoire 18° C.

Par contre, dans le mélange venin-lécithine la mort était plus rapide. Dans le cas de l'eau distillée la durée de survie était respectivement de six heures et quart et de trois heures et demie pour des concentrations en venin de 1/20.000e et de 1/4.000e; dans le cas du sérum physiologique elle était de cinq heures et demie et de deux heures et quart pour les concentrations de 1/20.000e et de 1/4.000e.

Ce fait est d'autant plus probant que des expériences-témoins faites avec une solution de lécithine seule ont montré que cette solution qui n'était pas hémolytique pour les hématies n'était pas toxique pour les

têtards. L'augmentation de toxicité conférée au venin par la présence des lécithine cadre une fois de plus avec la théorie de Fourneau (formation de lysocithine).

Dans une troisième série d'expériences nous avons recherché quelle pourrait être l'influence de la température sur le mélange venin-lécithine et, partant, sur la formation de la lysocithine.

Le mélange venin-lécithine était constitué par une solution de venin au 1/2.000e et par une suspension de lécithine au 1/10.000e dans une solution de chlorure de sodium à 4,5 p. 1.000. Nous portons le mélange pendant une heure aux différentes températures 60° C, 50° C, 37° C. Nous attendons une demi-heure pour que les mélanges reprennent la température du laboratoire, soit 18°, et nous mettons les têtards dans les milieux ainsi préparés.

Les temps moyens de survie dans le mélange venin-lécithine maintenu à 60° C sont de quatre heures trois quarts, de cinq heures dans le mélange maintenu à 50° C et de cinq heures et quart dans le mélange maintenu à 37° C.

Parallèlement, nous portons des solutions de venin dans le sérum physiologique à 4,5 p. 1.000 pendant une heure à 60° C, 50° C, 37° C et nous faisons une expérience analogue à la précédente. Les solutions de venin sont moins toxiques puisque les temps de survie sont respectivement de quatorze heures trois quarts et onze heures trois quarts et douze heures.

Dans le cas du mélange venin-lécithine le pouvoir toxique croît donc avec la température à laquelle a été porté le mélange avant l'expérience.

Nous avons montré que le pouvoir hémolytique croît également avec la température jusqu'à 70° C, température optima. Par contre, le pouvoir toxique du venin décroît avec la température, ce qui est conforme aux résultats trouvés par de nombreux auteurs sur l'action du chauffage en milieu neutre.

Si nous comparons les résultats de nos expériences à ceux de Mlle Ledebt, le venin de *vipera aspis* semble beaucoup moins toxique pour les têtards que le venin de cobra. En effet, dans des conditions sensiblement comparables (volume du liquide : 40 centimètres cubes et eau distillée) la mort se produisait en quatre à six heures avec des solutions de venin de cobra à 1/200.000e alors que dans nos expériences avec une solution de venin de *vipera aspis* au 1/20.000e la mort survenait au bout de sept heures et demie.

Mlle Ledebt avait d'ailleurs constaté que les venins de cobra et de daboïa (*vipera russeli*) présentent vis-à-vis des poissons à peu près la même toxicité, alors que vis-à-vis des têtards le venin de daboïa est 10 à 12 fois moins toxique que le venin de cobra. C'est un fait dont il n'y a pas lieu de nous étonner car des individus d'espèce différente peuvent se montrer très inégalement susceptibles à l'égard d'un même venin.

Ces différences rappellent celles que nous avons rencontrées dans l'action du venin de *vipera aspis* sur les globules rouges : certaines

espèces globulaires se montrant réfractaires à l'égard d'un venin déter miné alors que, dans les mêmes conditions, les globules d'autres espèces sont très facilement hémolysés.

CONCLUSIONS.

Les suspensions de lécithine ne sont point toxiques pour les têtards, les solutions de venin le sont peu, tandis que les mélanges venin-lécithine présentent le maximum de toxicité, ce qui vient à l'appui de la théorie de Fourneau (formation de lysocithine).

Le pouvoir toxique du venin décroît avec la température à laquelle on porte préalablement les solutions; au contraire, la toxicité des mélanges venin-lécithine croît comme le pouvoir hémolytique avant d'atteindre sa valeur optima vers 70° C.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans les diverses conditions qui ont été précisées et sous réserve des remarques qui ont été faites au cours même de l'exposé, nous croyons donc pouvoir conclure de la façon suivante :

1° La résistance des hématies de différentes espèces vis-à-vis de l'action hémolytique du venin de *vipera aspis* en présence d'une suspension de lécithine se trouve être sensiblement dans l'ordre décroissant suivant : vipère, veau, mouton, bœuf, homme, cheval, cobaye, porc;

2° Quelle que soit la nature des hématies, le taux de l'hémolyse croît avec la teneur en venin dans le cas des suspensions de lécithine. Au contraire, dans le cas du sérum, le taux de l'hémolyse passe par un maximum pour des concentrations de venin comprises entre 1/10.000e et 1/50.000e;

3° Lorsque le titre des suspensions de lécithine croît, le taux de l'hémolyse augmente et passe par un maximum pour une teneur en lécithine de l'ordre de 1/10.000e. L'existence de ce maximum est particulièrement nette pour les faibles concentrations en venin.

En ce qui concerne le cas remarquable où le taux de la lécithine est nul, de toutes les hématies expérimentées, seules celles de cobaye subissent l'hémolyse et d'ailleurs de façon excessivement légère;

4° Si, dans le cas du couple venin-lécithine, on fait varier l'action de la température sur la formation de la lysocithine, on note l'existence d'un optimum aux environs de 70° C;

5° Lorsqu'on étudie les variations du taux de l'hémolyse en fonction de la température à laquelle agit la lysocithine formée on trouve que pour les hématies de cobaye et en présence de lécithine, l'hémolyse est d'autant plus importante qu'elle se produit à une température plus élevée (de 0 à 37° C) ; pour les hématies de cheval et en présence de lécithine, l'hémolyse ne croît pas proportionnellement à la température (minimum à 20° C) ; pour les hématies de cheval et en présence de sérum de cheval, l'hémolyse est d'autant plus importante que la température est plus basse (de 0 à 37° C) ;

6° En présence d'une suspension artificielle de lécithine la formation de lysocithine croît avec l'augmentation du temps de

contact pour aboutir assez rapidement à une valeur maxima. Par contre en présence de sérum il existe un temps de contact fonction de la richesse en venin;

7° Tous les autres facteurs restant constants le pouvoir hémolytique de la lysocithine formée est d'autant plus important que le temps de contact entre hématies et lysocithine est plus long, que la lysocithine résulte soit du couple venin-lécithine soit du couple venin-sérum;

8° En ce qui concerne l'action du sérum antivenimeux, quatre cas doivent être considérés suivant que l'addition du sérum antivenimeux est faite avant ou après formation de lysocithine et selon que cette lysocithine provient du couple venin-sérum ou venin-lécithine.

Dans les quatre cas nous observons l'action antihémolytique du sérum antivenimeux par rapport au tube-témoin renfermant des doses égales de sérum physiologique ou de sérum de cheval.

De plus, il nous a semblé que dans le cas du couple venin-sérum le sérum antivenimeux agirait plus par inhibition de la transformation de lécithine en lysocithine que par neutralisation de la lysocithine formée. L'inverse a été noté dans le cas du couple venin-lécithine;

9° A partir d'une certaine concentration les suspensions de cholestérol s'opposent de façon notable à l'hémolyse, que cette addition soit faite avant ou après la formation de lysocithine;

10° L'activité du complexe venin-sérum ne nous a pas permis d'établir un rapport précis entre le degré de cette activité et l'espèce animale qui avait fourni le sérum; toutefois, le sérum de cheval favoriserait nettement l'hémolyse;

11° En ce qui concerne l'action cytolytique générale du venin appréciée, en se servant, comme test, de la durée de survie des têtards, on note que la toxicité du venin est nettement accrue en présence de lécithine.

En définitive, outre les notations nouvelles propres au venin de vipère qu'il nous a été donné de faire au cours de cet exposé, l'ensemble de ces résultats se trouve bien d'accord avec la théorie aujourd'hui classique de DELEZENNE qui confère au venin des propriétés diastastiques lui permettant de transformer la lécithine inactive en lysocithine hémolytique.

Ainsi que nous venons de le voir, le caractère diastasique du venin est beaucoup plus net lorsqu'on opère sur une solution artificielle de lécithine que sur du sérum; et, il le sera probablement plus encore lorsqu'on pourra opérer non plus sur le venin lui-même mais sur la diastase même qu'il renferme et qui est responsable de ce phénomène.

BIBLIOGRAPHIE [1]

ARGAUD (R.), BILLARD (G.). — Sur l'apparition des globules rouges nucléés au cours de l'envenimation. (*C. R. Soc. Biol.* 1910, LXVIII, 810.)

— Sur la coagulation du sang chez la vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1911, LXXI 583.)

ARTHUS (M.). — De l'anaphylaxie à l'immunité. (*Paris, Masson*, 1921.)

— Les anavenins 8 mémoires. (*Journ. physiol. et pathol.;* 1930, XXVIII, 529, 773, 800; 1931, XXIX, 256, 462, 705; 1932, XXX, 75, 880.)

— Les venins in Traité de physiologie normale et pathologie de Roger et Binet. (Vol. 1, *Masson, Paris*, 1935.)

BARBES (L.). — Contribution à l'étude du venin de vipère comme anti-épileptique et puissant diurétique. (*Concours médical*, mars 1930.)

BELFANTI (S.). — Les lipoïdes dans l'hémolyse. (*Rapport* 1er *Congrès international de microbiologie*, Paris, 1930.)

— La dégradation des lécithines. (*Arch. ital. de biol.* 1934, XCI, 139.)

BERTRAND (G.), et VLADESCO (R.). — Sur la variation cyclique annuelle de toxicité du sang de la vipère. (*C. R. Ac. des Sc.* 1941, CCXII, 1063; *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1941, XXIII, 327.)

— Sur l'action hyperglycémiante des venins de serpents. (*Bull. Soc. Chim. Biol.* 1940, XXII, 299.)

BESREDKA (A.). — De la sérothérapie locale dans l'empoisonnement par le venin des vipères. (*C. R. Soc. Biol.* 1933, CXII, 345.)

BILLARD (G.). — Immunité naturelle du lérot après hibernation et immunité naturelle du blaireau contre le venin de vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1910, LXVIII, 982.)

BILLARD (G.) et MAUBLANT (E.). — Sur l'immunité naturelle du canard domestique et de la chouette (chevêche commune) contre le venin de vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1910, LXIX, 316.)

BILLARD (G.). — Sur l'immunité naturelle du chat domestique contre le venin de vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1910, LXIX, 318.)

— Immunisation du cobaye contre le venin de vipère par le suc d'autolyse du foie de porc. (*C. R. Soc. Biol.* 1910, LXIX, 487.)

— Anaphylaxie du cobaye pour l'hémorragine du venin de vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1910, LXIX, 519.)

BILLARD (G.), MOUGEOT (A.) et MERLE (E.). — La systole sinusale de la vipère, de la couleuvre et de la tortue. (*C. R. Soc. Biol.* 1914, LXXVII, 75.)

BILLARD (G.) et DODEL (P.). — Les mœurs des animaux en rapport avec la disposition des yeux et la forme des pupilles. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, LXXXVI, 153.)

(1) Pour les travaux antérieurs à 1922, nous prions le lecteur de bien vouloir se reporter à l'ouvrage de M. PHISALIX : *Animaux venimeux et venins.*

Billard (G.). — Pouvoir anagotoxique du sulfate de spartéine sur le venin de vipère d'Auvergne. (*C. R. Soc. Biol.* 1926, XCIV, 650.)

— Pouvoir anagotoxique des eaux de Châtelguyon sur le venin de vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1926, XCIV, 1140.)

— La phylaxie. (*Doin, Paris*, 1931.)

Boquet (P.). — Sur le rôle de quantités infinitésimales de cuivre dans l'atténuation du venin de vipère par l'eau oxygénée. (*C. R. Soc. Biol.* 1939, CXXXI, 7 : 1941, CXXXV, 781 ; *Ann. Inst. Past.* 1941, LXVI, 379.)

Boudin (P.). — Les venins en thérapeutique. (*Thèse méd.* Paris, 1939.)

Brazil (V.). — La défense contre l'ophidisme. (*Sao Paulo*, 1914.)

Calmette (A.). — Sur l'action hémolytique du venin de cobra. (*C. R. Ac. des Sc.* 1902, CXXXIV, 1446.)

— Les venins. (*Masson, Paris*, 1907.)

Calmette (A.) et Massol (L.). — Etude comparée des propriétés antitoxiques préventives et thérapeutiques d'un sérum antivenimeux au cours des saignées successives. (*Bull. de la Soc. de path. exot.* 1908, I, 90.)

Calmette (A.), Nègre (L.) et Boquet (A.). — Manuel technique de microbiologie et sérologie. (*Masson, Paris*, 1925.)

Césari (E.), Bauche (J.) et Boquet (P.). — Sur une race de vipères aspic à venin blanc. (*C. R. Acad. des Sc.* 1935, CCI, 683.)

Césari (F.) et Boquet (P.). — Recherches sur les antigènes des venins et les anticorps des sérums antivenimeux. (*Ann. Inst. Past.* 1935, LV, 307 ; 1936, LVI, 171 et 511 ; 1937, LVIII, 6.)

— Détoxication du venin de *vipera aspis*, par le ricinoléate de soude. (*C. R. Soc. Biol.* 1937, CXXV, 231 ; 1937, CXXVI, 570.)

— Sur le mécanisme de la détoxication du venin de *vipera aspis* par l'aldéhyde formique. (*C. R. Soc. Biol.* 1939, CXXX, 19.)

— Etude sur le venin blanc de *vipera aspis*. (*Ann. Inst. Past.* 1939, LXIII, 592.)

Cordier (Mlle G.). — De la résistance globulaire comparative de quelques espèces animales. (*C. R. Soc. Biol.* 1930, CV, 165.)

Dastugue (G.) et Piton (L.). — Inhibition cellulaire et bouillon de peau de vipère. (*Revue médicale* 1933, VI, 13.)

Dastugue (G.). — Les vipères vues par les physiologistes. (*Bull. de l'Ac. des Sc., Lettres et Arts de Clermont-Ferrand*, 1941, LXI.)

Dastugue (G.) et Joy (Mme). — Les éléments figurés du sang de vipère. (*C. R. Soc. Phys. Biol.* 1941, XLV, 3)

Dastugue (G.) et Joy (Mme). — Nouvelles recherches sur la composition du sang de *vipera aspis*. (*C. R. Soc. Phys. Biol.* 1942, LVII, 77.)

Dastugue (G.) et Souquière (J.). — Les larves de batracien : réactif biologique. (*Maloine, Paris*, 1942.)

Delas (R.). — Cholestérolémie et résistance osmotique des hématies. (*C. R. Soc. Biol.* 1933, CXIII, 1019.)

Delezenne (C.) et Ledebt (Mlle). — Action du venin de cobra sur le sérum de cheval. Ses rapports avec l'hémolyse. (*C. R. Ac. des Sc.* 1911, CLII, 790.)

— Formation de substances hémolytiques et de substances toxiques aux dépens du vitellus de l'œuf soumis à l'action des venins de cobra. (*C. R. Ac. des Sc.* 1911, CLIII, 81.)

— Nouvelle contribution à l'étude de substances hémolytiques dérivées du sérum et du vitellus de l'œuf soumis à l'action des venins. (*C. R. Ac. des Sc.* 1912, CLV, 1101.)

Delezenne (C.) et Fourneau (E.). — Contribution du phosphatide hémolysant (lysocithine) provenant de l'action du venin de cobra sur le vitellus de l'œuf de poule. (*Bull. de Soc. chim. de France*, 1914, XV, 421.)

Delezenne (C.). — Le zinc; sa présence et son rôle dans le venin des serpents. (*Th. Sc. Nat.*, Paris 1919.)

Diacono (H.). — Le phénomène hémolytique. (*Th. pharmacien sup.*, Montpellier, 1933.)

Dodel (P.). — La phylaxie cellulaire, in données expérimentales relatives aux phénomènes de phylaxie. (*Clermont-Ferrand*, 1929, 45.)

— Réactions pharmacodynamiques de l'oviducte isolé de vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1932, CX, 1921.)

— Sur la présence dans le sang de la femme enceinte « d'une substance empêchante » de l'action ocytocique du lobe postérieur d'hypophyse. Sa disparition à l'accouchement. (*XIV^e Congrès Internat. Physiol.; Rome*, 1932.)

Dodel (P.) et Febvre (P.). — Eléments minéraux du sérum sanguin et survie d'organes isolés de *vipera aspis*. (*Bul. Soc. Chim. Biol.* 1932, XIV, 272.)

Dodel (P.), Dastugue (G.) et Piton (L.). — Etude expérimentale et clinique de l'action diurétique des injections d'extrait de peau de vipère. (*Congrès de médecine de Barcelone*, juin 1934.)

Dodel (P.) et Touchard (Mme). — Etude critique et expérimentale des causes déterminantes du travail de l'accouchement. (*La Gazette médicale du Sud-Ouest*, 1935, XLII, 111.)

Fabre (R.). — Sur un procédé spectrométrique d'étude de l'hémolyse. (*Journ. Pharm. Chim.* 1926, IV, 247.)

— Etude de l'hémolyse par la digitonine, par la quinine et par hypotonie. (*Journ. Pharm. Chim.* 1926, IV, 835.)

Fabre (R.) et Simonnet (H.). — Etude de l'action photo-sensibilisatrice de l'hématoporphyrine. (*Jour. Pharm. Chim.* 1926, IV, 294.)

— Contribution à l'étude de l'hémolyse par l'action photosensibilisatrice de l'hématoporphyrine. (*C. R. Ac. des Sc.* 1927, CLXXXIV, 707.)

Fourcade (M.). — La résistance globulaire. Sa mesure; interprétation des résultats. (*Montpellier médical* 1937, XII, 79.)

Fourneau. — Préparation des médicaments organiques (*J.-B. Baillière, Paris*, 1921.)

Franzi (L.). — Quelques caractères et modalités d'action des principes lytiques du venin de *vipera aspis*. (*Bioch. e. Ter. spr.* 1937, XXIV, 1.)

Fredet (G.-E.). — Considérations sur la morsure de la vipère en Auvergne. (*Assoc. franç. pour l'avancement des sciences*, Clermont-Ferrand, 1876.)

Fuhner et Neubauer. — Pouvoir hémolytique des alcools. (*Zentrabl. f. Physiol.*, 1906, XX.)

Galugareanu et Henri (V.). — La résistance des globules rouges du sang déterminée par la conductibilité électrique. (*C. R. Ac. des Sc.* 1902, CXXXIV, 483.)

Gellhorn (E.) et Régnier (J.). — La perméabilité. (*Masson, Paris*, 1936.)

Guerrini (G.). — Recherches sur les lysocithines. (*Arch. Ital. Biol.* 1926, LXXVII, 136.)

HALPERN (N.). — Le venin de *vipera aspis*. (*Thèse méd.*, Paris, 1936.)

HAMBURGER. — La résistance des globules rouges. (*Rapport au XIII^e^ Congrès international de médecine*, Paris, 1900.)

HOUSSAY (B.-A.), OTERO (M.-J.), NEGRÈTE (J.) et MAZZOCCO (P.). — Action des venins coagulants de serpents sur le sang. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, LXXXVI, 411.)

— Action des venins des serpents sur le nerf et le muscle isolés. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, LXXXVII, 823.)

— Action hémolytique comparative des venins des serpents sud-américains. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, LXXXVII, 828.)

HOUSSAY (B.-A.) et GUGLIELMETTI. — Mécanisme de la curarisation par les venins de serpents. (*C. R. Soc. Biol.* 1923, LXXXVIII, 367.)

HOUSSAY (B.-A.), — Action locale des venins de serpents. (*C. R. Soc. Biol.* 1923, LXXXIX, 55.)

HOUSSAY (B.-A.) et MAZZOCCO (P.). — Mécanisme de l'action des venins de serpents sur le muscle strié. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, XCIII, 1120.)

— Action des venins de serpents sur la diffusion du potassium, des phosphates et de l'hémoglobine. (*C. R. Soc. Biol.* 1926, XCV, 1502.)

HOUSSAY (B.-A.). — Classification des actions de venins de serpents sur l'organisme animal. (*C. R. Soc. Biol.* 1930, CV, 308.)

LACASSAGNE (A.) et ROYER (M.). — Influence de l'imbibition sur la radiosensibilité : expériences avec le venin de vipère. (*C. R. Soc. Biol.* 1938, CXXIX, 434.)

LEDEBT (Mlle). — Contribution à l'étude des propriétés biologiques des venins. (Paris, *Thèse Sc. Nat.* 1913.)

LEFÈVRE (J.). — Manuel critique de biologie. (*Masson, Paris*, 1938.)

LEROY (Mlle). — Le venin de la vipère commune en thérapeutique humaine. (*Thèse pharmacie*, Paris, 1937.)

MAGENTA (M.-A.). — Action des venins de serpents sur le cœur. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, LXXXVII, 834.)

MARX (W.) et PECK (S.-M.). — Possibilité de séparer par la cataphorèse les deux éléments toxiques, hémolytique et hémorragique du venin de serpent. (*Proc. Soc. expér. Biol.* 1938, XXXVIII, 384.)

MAUBLANT (E.). — Immunité naturelle de certains animaux contre les morsures de serpents venimeux (vipère, cobra) et essai d'immunisation préventive. (*Thèse médecine*, Paris, 1911.)

MAY (E.). — Etude sur les résistances globulaires. (*Thèse méd.*, Paris, 1913.)

MAYER et SCHÆFFER. — Composition chimique du sang et hémolyse. (*C. R. Ac. des Sc.* 1912, CLV, 728 ; *J. de Phys. et Path. Gén.* 1914, XVI, 1 et 23.)

MILKOVITCH (G.). — Sur la nature du pouvoir antihémolytique des sérums chauffés. (*C. R. Soc. Biol.* 1923, LXXXIX, 877.)

NICOL (L.) et RICHOU (R.). — Toxicité pour le cobaye du venin de *vipera aspis* enrobé dans la lanoline. (*C. R. Soc. Biol.* 1935, CXVIII, 942.)

NICOL (L.) et MUSTAFA (A.). — Sur l'injection au cobaye des venins d'aspis et de cobra incorporés à l'huile de vaseline cholestérolée. (*C. R. Soc. Biol.* 1936, CXXI, 494.)

— De l'absence d'antivenin d'origine naturelle vis-à-vis des venins de *vipera aspis* et de *naja tripudians* chez l'homme et chez différentes espèces animales. (*C. R. Soc. Biol.* 1935, CXX, 391.)

Noc (F.). — Sur quelques propriétés hémolytiques des différents venins de serpents. Pouvoir hémolytique comparé des venins. (*Ann. Inst. Past.* 1904, XVIII, 304-406.)

Nolf (P.). — Le mécanisme de la globulolyse. (*Ann. Inst. Past.* 1900, XIV, 492 et 656.)

Pacella (G.). — Action des venins de serpents sur les centres bulbaires. (*C. R. Soc. Biol.* 1923, LXXXVIII, 366.)

Phisalix (M.). — Animaux venimeux et venins. (*Masson, Paris*, 1922.)

Phisalix (M.) et Pasteur (F.). — Action des rayons ultra-violets sur le venin de la vipère aspic. (*C. R. Ac. des Sc.* 1928, CLXXXVI, 538.)

Phisalix (M.). — Pouvoir rabicide *in vitro* du venin de la vipère aspic. (*C. R. Ac. des Sc.* 1928, CLXXXVI, 795.)

— Les rayons ultra-violets détruisent le pouvoir rabicide du venin de la vipère aspic. (*C. R. Ac. des Sc.* 1928, CLXXXVI, 975.)

— L'action des rayons ultra-violets sur le sérum de la vipère aspic. (*C. R. Ac. des Sc.* 1928, CLXXXVI, 1756.)

— Vaccination contre le venin de vipère et la rage expérimentale par les mélanges virus-venin. (*C. R. Ac. des Sc.* 1928, CLXXXVII, 106.)

Phisalix (M.) et Pasteur (F.). — Action des diverses radiations sur les composants actifs du venin de vipère. (*Cong. int. de la lumière*, Copenhague, 1932.)

Phisalix (M.). — Action vaccinante réciproque des venins d'abeille et de vipère aspic. (*C. R. Ac. des Sc.* 1932, XCIV, 2086.)

— Action des diverses radiations sur les venins, les antivenins naturels ou préparés, leur mélange neutre. [*Mém. in Ann. Sc. Nat.* (*Zool*), 1936, XIX, 215.)

Phisalix (M.). — Le venin des vipéreaux de vipère aspic. (*Bull. Soc. Zool. de France*, 1937, 443.)

— Le venin blanc des vipères du département du Gers est dépourvu de pouvoir vaccinant. (*C. R. Ac. des Sc.* 1939, CCVIII, 1252.)

— La tête de la vipère peut encore mordre avec effets caractéristiques, d'un seul crochet, trente minutes après avoir été séparée du corps. (*Bull. Soc. Path. Comp.* 1939, 454 et 636.)

— Vipères de France. (*Stock, Paris*, 1940.)

Piton (L.). — Lipoïdes, peau de vipère, cancer et diurèse. (*Thèse méd.*, Toulouse, 1934.)

Potick (D.). — Action des venins de serpents sur les lipides du plasma sanguin. (*C. R. Soc. Biol.* 1930, CV, 307.)

Richet (Ch.). — Hémolyse. (*Dict. de physiol.* 1908, VIII, 397.)

Rollinat (R.). — La vie des reptiles. (*Paris, Delagrave*, 1934.)

Touchard (Mme). — Contribution à l'étude du déclenchement physiologique du travail de l'accouchement. (*Thèse méd.*, Toulouse, 1932.)

Vellard (J.). — Spécificité des sérums anti-ophidiques. (*Ann. Inst. Past.* 1930, XLIV, 148.)

Vellard (J.) et Jarbas-Panteado. — Action des rayons ultra-violets sur le venin (*C. R. Ac. des Sc.* 1930, CXCI, 458.)

Volcan (R.). — Contribution à l'étude du mode d'action des venins. (*Thèse méd.* Paris, 1939.)

TABLE DES MATIÈRES

Pages.

INTRODUCTION. 1

PREMIÈRE PARTIE.

ESSAI D'INTRODUCTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS HÉMOLYTIQUES DU VENIN DE *VIPERA ASPIS*.

CHAPITRE 1er. — *La « vipera aspis »* 5
CHAPITRE II. — *Le venin de « vipera aspis »* 15
CHAPITRE III. — *Le mécanisme de l'action hémolytique des venins : premières recherches.* 24
CHAPITRE IV. — *Le mécanisme de l'action hémolytique des venins : théorie chimique.* 27
CHAPITRE V. — *Le mécanisme de l'action hémolytique des venins : théorie diastasique.* 30

DEUXIÈME PARTIE.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

INTRODUCTION. 37
CHAPITRE Ier. — *Technique générale.* 39
CHAPITRE II. — *Nature des hématies.* 44
CHAPITRE III. — *Taux du venin.* 52
CHAPITRE IV. — *Taux de la lécithine.* 55
CHAPITRE V. — *Influence de la température* 60
CHAPITRE VI. — *Influence du temps de contact* 73
CHAPITRE VII. — *Sérum antivenimeux.* 77
CHAPITRE VIII. — *Action inhibitrice du cholestérol.* 86
CHAPITRE IX. — *Nature des sérums.* 89
CHAPITRE X. — *Action cytolytique sur les têtards.* 92

CONCLUSIONS GÉNÉRALES. 96
BIBLIOGRAPHIE. 98

Vu :

Clermont-Ferrand, le 19 juin 1943.

Le Président du Jury,

Y. VOLMAR.

Vu et approuvé :

Clermont-Ferrand, le 21 juin 1943.

Pour le Doyen de la Faculté de pharmacie :

L'Assesseur,

Y. VOLMAR.

Vu et permis d'imprimer :

Clermont-Ferrand, le 22 juin 1943.

Le Recteur de l'Académie, Président du Conseil de l'Université.

Pour le Recteur :

Le Vice-Président du Conseil,

A. DANJON.

IMPR. CHARLES-LAVAUZELLE ET Cie, 31-2271. — PARIS, LIMOGES, NANCY. — 1943
Dépôt légal 1er trimestre 1944. — Mme Darraud, éditeur.